

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—44399

⑪ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和59年(1984) 3月12日
C 07 H 21/04		7252—4C	
C 12 N 1/00		6760—4B	発明の数 4
15/00		7115—4B	審査請求 未請求
C 12 P 21/00		7235—4B	
// A 61 K 39/395		7043—4C	
C 07 C 103/52		6667—4H	
C 12 P 19/34		7258—4B	
(C 12 N 1/00			
C 12 R 1/19)		6760—4B	
(C 12 P 21/00			
C 12 R 1/19)		6760—4B	(全 16 頁)

⑭ 新規DNA

7丁目4番地の16

⑮ 特 願 昭57—156285

⑯ 出 願 人 武田薬品工業株式会社

⑰ 出 願 昭57(1982) 9月7日

大阪市東区道修町2丁目27番地

⑱ 発 明 者 菊池正和

⑲ 代 理 人 弁理士 天井作次

最終頁に続く

大阪府豊能郡豊能町東ときわ台

明 細 書

1. 発明の名称

新規DNA

2. 特許請求の範囲

(1) 第1図においてヌクレオチド配列831—1485として示されるポリヌクレオチドを含有するDNA。

(2) 第1図においてヌクレオチド配列490—830として示されるポリヌクレオチドまたはその断片が、同図においてヌクレオチド配列831—1485として示されるポリヌクレオチドの5'末端に連結されている特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(3) 第1図においてヌクレオチド配列88—489として示されるポリヌクレオチドまたはその断片が、5'末端に連結されている特許請求の範囲第2項記載のDNA。

(4) 第1図においてヌクレオチド配列1—87として示されるポリヌクレオチドまたはその断片が5'末端に連結されている特許請求の範囲第3項記

載のDNA。

(5) 5'末端に脱み取り枠が一致するようにATGを有することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第4項記載のDNA。

(6) 第2図において、アミノ酸配列278—494として示されるポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(7) 第2図において、アミノ酸配列164—277として示されるポリペプチドまたはその断片が同図においてアミノ酸配列278—494として示されるポリペプチドのN末端に連結されているポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載のDNA。

(8) 第2図において、アミノ酸配列30—163として示されるポリペプチドまたはその断片が特許請求の範囲第7項記載のポリペプチドのN末端に連結されているポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載のDNA。

(9) 第2図において、アミノ酸配列1—29として示されるポリペプチドまたはその断片が特許請

求の範囲第8項記載のポリペプチドのN末端に連結されているポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第4項記載のDNA。

(a) N末端にMetを有するポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第9項記載のDNA。

(b) ヒト免疫グロブリンE H鎖のポリペプチドと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第10項記載のDNA。

(2) 組み換えDNA分子の一部であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第11項記載のDNA。

(3) プロモーターの下流に連結されていることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第12項記載のDNA。

(4) プロモーターがトリプトファンプロモーターであることを特徴とする特許請求の範囲第13項記載のDNA。

(5) ヒト免疫グロブリンE H鎖ポリペプチドを

コードするmRNAを逆転写することを特徴とする第1図においてヌクレオチド配列831-1485として示されるポリヌクレオチドを含有するDNAの製造法。

(6) 第1図においてヌクレオチド配列831-1485として示されるポリヌクレオチドを含有するDNAを有する組み換え体。

(7) 大腸菌であることを特徴とする特許請求の範囲第16項記載の組み換え体。

(8) 第1図においてヌクレオチド配列831-1485として示されるポリヌクレオチドを含有するDNAを有する組み換え体を培養し、培養物中にヒト免疫グロブリンE H鎖のポリペプチドまたはこれと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を有するポリペプチドを生成誘導せしめ、これを選択することを特徴とするヒト免疫グロブリンE H鎖のポリペプチドまたはこれと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を有するポリペプチドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規なDNAに関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト免疫グロブリンE H鎖のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するDNA、当該DNAを含有する組み換え体、ならびに当該組み換え体の培養によるヒト免疫グロブリンE H鎖のポリペプチドの製造法を提供するものである。

動物体液中に存在し、抗体と密接な関係をもつ免疫グロブリンは、H (heavy) 鎖およびL (light) 鎖から成り、各々が抗原との結合特異性を規定するV領域とイフェクター (effector) 機能を規定するC領域を有し、H鎖の構成成分により、免疫グロブリン(Ig)A, D, G, M, Eの5種類に分類されている。

このうち、レアギンを構成する免疫グロブリンE (以下IgE) は、ヒトでは、その分子数が196,000ダルトンであり、75,500ダルトンのH鎖と22,500ダルトンのL鎖がそれぞれ2本ずつジスルフィド結合によって結ばれた分子である。IgEのH鎖のC領域はCH1～CH4の4

部位より成り、CH2において2本のH鎖がジスルフィド結合によって結ばれている。そして、アレルギー反応などの重要な生体反応を担っている。すなわち、アレルギー反応は特異抗原と結合したIgEの誘作された肥満細胞や好塩基球への結合によって誘起されることが知られている (K. Ishizaka and T. Ishizaka, Immunological Rev. 41, 109, 1978)。従って、アレルギー反応をおさえるために抗原結合部位を除いたIgE分子を用いることも考えられている。しかし生体内でのIgEに起因する種々の反応については、まだ未解決な点が多い。十分な量のヒトIgEを供給できないことが、この理由の一つとなっている。

また一方、抗IgE抗体はアレルギー疾患の診断に必要欠くべからざる物質であり、需要も非常に多いが、その生産には大量の純化ヒトIgEを必要とする。これらの理由のため、ヒトIgEを安価に大量生産できる技術の開発が待たれていた。

IgEの生産方法としては、ヒトIgE産生能

を有する株化ヒト骨髓腫細胞の培養上清より分取精製する方法が提唱されているが、細胞培養であること、細胞の増殖能が低いことなどから、安価に大量のIgEを得るのは難しい。

本発明者らはすでに、ヒトIgEをコードするmRNAを細胞から分離することに成功している(昭和56年特許出願第56-120555号、昭和56年7月30日付出版)。

本発明者らはさらに、このmRNAをもとに研究を進め、遺伝子操作技術を利用してヒトIgE H鎖のポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングし、得られた組み換えDNA分子を宿主に導入して、ヒトIgE H鎖のポリペプチドを得ることのできる技術の開発研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はヒトIgE H鎖のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するDNA、該DNAを含有する組み換え体、ならびに該DNAを含有する組み換え体を培養することによるヒトIgE H鎖のポリペプチドまたはこ

リペプチドを含有する。

同様に、第1図においてヌクレオチド配列1-1485として示されるポリヌクレオチドは、第2図においてアミノ酸配列1-494として表わされるポリペプチドをコードする。このポリペプチドはヒトIgE H鎖のCH1~CH4のポリペプチドを含有する。

これらのポリヌクレオチドは、直接発現のために、5'末端に読み取り枠を一致させるように、A T Gを有していてもよい。この場合には、N末端にMetを有するポリペプチドをコードする。

これらのポリヌクレオチドまたは読み取り枠を一致させるように5'末端にA T Gを有する当該ポリヌクレオチドはプロモーターの下流に連結されていることが好ましく、プロモーターとしてはトリプトファン合成(trp)プロモーター、recAプロモーター、ラクトースプロモーター等があげられ、とりわけtrpプロモーターが好適である。

本発明細書、図面および特許請求の範囲で用いる記号の意義は第1表に示すとおりである。

れと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を有するポリペプチドの製造法を提供するものである。

本発明で得られるDNAは、第1図に示されるヌクレオチド配列のポリヌクレオチドを含有するDNAである。

このうち、第1図においてヌクレオチド配列831-1485として示されるポリヌクレオチドは、第2図においてアミノ酸配列278-494で表わされるポリペプチド、つまりヒトIgE H鎖のCH3~CH4をコードする。

次に、第1図においてヌクレオチド配列490-¹⁴⁸⁵~~831~~として示されるポリヌクレオチドは、第2図においてアミノ酸配列164-494として表わされるポリペプチド、つまりヒトIgE H鎖のCH2~CH4をコードする。

また、第1図においてヌクレオチド配列88-1485として示されるポリヌクレオチドは、第2図においてアミノ酸配列30-494として表わされるポリペプチドをコードする。このポリペプチドはヒトIgE H鎖のCH1~CH4のポ

第 1 表

DNA	デオキシリボ核酸
cDNA	相補的デオキシリボ核酸
RNA	リボ核酸
mRNA	伝令リボ核酸
A	デオキシアデニル酸
T	チミジル酸
G	デオキシグアニル酸
C	デオキシシチジル酸
U	ウリジル酸
dATP	デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	チミジン三リン酸
dGTP	デオキシグアニン三リン酸
dCTP	デオキシシチジン三リン酸
ATP	アデノシン三リン酸
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	グリシン
Ala	アラニン
Val	バリン

Leu	ロイシン
Ile	イソロイシン
Ser	セリン
Thr	スレオニン
Cys	システイン
Met	メチオニン
Glu	グルタミン酸
Asp	アスパラギン酸
Lys	リジン
Arg	アルギニン
His	ヒスチジン
Phe	フェニルアラニン
Tyr	チロシン
Trp	トリプトファン
Pro	プロリン
Asn	アスパラギン
Gln	グルタミン
bp	塩基対

本発明においては、昭和56年特許願第56-120555号に記載されている方法もしくはこ

5. 7 M CsCl 溶液上に重層して遠心分離、フェノールによる抽出によってRNAを抽出する。ついでオリゴ(dT)セルロース、ポリ(U)セファロースなどを用いて、ポリアデニル酸を含むRNAを集め、さらにショ糖密度勾配遠心処理で分離してmRNAを得る。

こうして得られたmRNAを鋳型として、たとえば、逆転写酵素を用いてそれ自体公知の方法で単鎖cDNAを合成し、さらにこのcDNAの二本鎖DNAへの変換を行う(Maniatis, T. ら, Cell, 8, 163(1976))。

このDNAをたとえばdG-dCあるいはdA-dTホモポリマー結合法(Nelson, T. S., Methods in Enzymology, 68, 41(1979) Academic Press Inc. New York)で、pBR 322のPst IあるいはSph I 制限エンドヌクレアーゼ切断部位に組み込ませる。これをたとえば大腸菌X1776株に導入して形質転換させ、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性により組み換え体を選ぶことができる。

れに準ずる方法によって製造されたヒトIgE H鎖ポリペプチドをコードするmRNAを用い、これを鋳型として、たとえば逆転写酵素を用いて、単鎖のcDNAを合成し、二本鎖DNAに導き、前記(エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ)を用いて消化し、アダプターを付加してプラスミドに導入したのち、たとえば大腸菌などに組み込み、得られる組み換え体を培養してcDNA含有プラスミドを単離することにより、ヒトIgE H鎖のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを製造することができる。

ここで用いるmRNAは、たとえば下記の方法により製造することができる。

ヒトIgE 産生能を有する性化ヒト骨髓腫細胞U266を培養増殖し、得られた細胞を遠心分離によって集め、たとえば生理食塩水で洗ったのち、RNase阻害剤として、たとえばヘパリン ジエチルピロカーボネイトなどを加えた変性液中で、たとえばN-ラウリルサルコシン緩衝液中で細胞を溶解させて、それ自体公知の方法、たとえば、

ヒトIgE H鎖の構造遺伝子断片はすでにクローニングされており(Nishida ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3833 1982)、そのごく一部の塩基配列も解析されている。この遺伝子断片(大阪大学、医学部、木庭佑教授より入手)をたとえばニツクトランスレーション法(Rigby, P. W. J. ら, J. Mol. Biol., 113, 237(1977))により32pでラベルし、あるいはヒトIgE H鎖ポリペプチドのアミノ酸配列に対応すると考えられるヌクレオチド配列をもったオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを32pでラベルしてプローブとなしたとえばそれ自体公知のコロニーハイブリダイゼーション法(Grunstein, M. and Hogness, D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961(1975))によって、すでに得たテトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性のトランスフォーマントの中から求めるクローンを二次スクリーニングする。このコロニーハイブリダイゼーションによって陽性を示したクローンのヌクレオチド配列を、たとえばMaxam-Gilbert 法

(Maxam, A. M. & Gilbert, W., Proc. Natl. Sci. U.S.A., 74, 560 (1977))あるいはフーシム13を用いたジデオキシヌクレオチド合成経路停止の方法(Messing, J. 他, Nucleic Acids Res., 9, 309 (1981))の方法によって決定し、ヒトIgE H鎖ポリペプチドをコードする遺伝子の存在を確認する。次に、得られたクローンからヒトIgE H鎖ポリペプチドをコードする遺伝子の全部あるいは一部をきり出し、適当なプロモーター、SD (シャイン アンド ダルガーノ) 配列と開始コドンATGの下流につないで、これを適当な宿主に導入することもできる。また、プラスミドに組み込まれた適当な複製遺伝子、たとえば、 β -ラクタマーゼ遺伝子あるいはアンスラニレートセクターゼ遺伝子などの途中に組み込むことにより、これらの複製遺伝子産物の一部あるいは全部と連結したキメラポリペプチドとして発現させることもできる。

プロモーターとしては、前記のプロモーターが挙げられ、宿主としては、大腸菌や枯草菌などの

必要により、前記や混雑を加えることもできる。

培養後、公知の方法で菌体を集め、たとえば、緩衝液に懸濁させた後、たとえばリゾチーム処理、表面活性剤処理あるいは超音波処理で菌体を破壊し、遠心分離により上澄みを得る。

当該上澄み液からのヒトIgE H鎖のポリペプチドの単離は、通常知られている蛋白質の精製方法に従えばよいが、抗ヒトIgE抗体カラムクロマトグラフィなどの方法を用いることが、とりわけ有利である。

本発明により製造されるヒトIgE H鎖のポリペプチドまたはこれと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を有するポリペプチドは従来の方法で製造されたヒトIgE H鎖のポリペプチドと同等の免疫学的もしくは生物学的活性を示し、これと同様の目的に、同様の用法により使用することができる。

参考例 ヒトIgEをコードするmRNAの分離

(1) U-266細胞の培養

株化ヒト骨髓腫細胞U-266 (Immunology,

細菌が挙げられるが、大腸菌(294, 93110など)、とりわけ294が好ましい。

なお、294は公知の菌(Backman, K. 他, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 4174 (1976))で財団法人「発酵研究所 (Institute For Fermentation Osaka) にIFO-14171として寄託もされている。

本発明のDNAによる宿主の形質転換は、例えば公知の方法(Cohen, S. N. 他, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972))により行う。

このようにして得られた組み換え体をそれ自体公知の培地で培養する。

培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地(Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972))が挙げられる。ここに、必要によりプロモーターを効率よく誘発させるために、たとえば 3β -インドリルアクリル酸のような誘発剤を加えることができる。

培養は通常15~43℃で3~24時間行い、

38, 63 (1979)) (細胞数 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$) をRPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) 培養液500 μl で10%の子牛胎児血清、およびペニシリン、ストレプトマイシン(武田薬品)を0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と共にローラボトルにより37℃で3日間培養した。

(2) ポリアデニル酸を含むRNAの調製

U-266細胞の全RNAを抽出する方法は主にグリシンらの方法に従った(Biochemistry, 13, 2633 (1974))。すなわち、培養3日後のU-266細胞をサーバル遠心機rotor GSAを使用して2500回転、5分遠心して集め、生理食塩水に懸濁した後、さらに2500回転で5分遠心して細胞を洗浄した。この細胞に5~10容量の4% N-ラウリルサルコシン緩衝液(和光純薬)(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリン(和光純薬)、0.2% ピロカルボン酸ジエチル(東京化成)、0.01 M Tris-HCl, pH 7.6)を加え、30 μl のテフロンホモジナイザーで15~20回すりつぶした。この溶液にCsClを0.5 g/ml となるように加

えた後、スピスコ SW 27 rotor用の遠心チューブ中の5.7 M CsCl 溶液7 ml上に重層し、26000回転で20時間遠心してRNAを沈降させた。チューブ中の上清を吸引除去した後、チューブの下方2 cm程度を残して上部を切り取った後、RNAの沈降を0.4%のN-ラウリルサルコシン緩衝液に溶解した。この溶液にNaClを0.2 Mとなるように加え、冷エタノールを最終濃度70%となるように加えてRNAを-20℃下に沈降させた。

(3) オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィによる分離

エタノール沈降したRNAをスピスコ SW 27, 1 rotorで20,000回転、20分間遠心して集めた後、10 mlの10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS緩衝液に溶解した。次にこれと同じ緩衝液に溶解したオリゴ(dT)セルロースを10 ccの注射筒に高さ4 cm (4 ml)に充め、上記のRNA試料をこのカラムに流し、素通りした部分を再度カ

ラムに流してポリアデニル酸を含むRNAを吸着させた。さらに、同じ緩衝液で紫外線260 nmの吸収がなくなるまでカラムを洗淨して未吸着のRNAを洗い流した後、10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.3% SDS緩衝液でポリアデニル酸を含むRNAをカラムから溶出し(1 ml/分) OD 260 nmの吸収でRNAを追跡した。RNA分画を集め、-20℃下にエタノール沈降した。

(4) ショ糖濃度勾配遠心法による分離

前記操作で得たポリアデニル酸を含むRNA約2 mgを0.05 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6), 0.2% SDS緩衝液に溶解した10~30%のショ糖濃度勾配溶液上に重層し、SW 27 rotorを使用して24,000回転で22時間20℃下に遠心した。この後、内容物を40本に分画し、OD 260 nmの吸収を測定した後18 S付近を中心5分画ごとに集め、エタノール沈降を行い沈降物としてmRNAを得た。

実施例ノ

(I) 単鎖DNAの合成

上記参考例で得た5 μ g mRNA および100ユニットの逆転写酵素(Life Science社)を用い、100 μ lの反応液(5 μ g オリゴ(dT), 1 mM ずつのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP, 8 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM ジチオスレイトール, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3)中で42℃, 1時間インキュベートした後、フェノールで除蛋白し、0.1 N NaOHで70℃, 20分処理してRNAを分解除去した。

(II) 二本鎖DNAの合成

ここで合成された単鎖の相補DNAを50 μ lの反応液(mRNAとオリゴ(dT)を含まない以外は上記と同じ反応液)中で42℃2時間反応させることにより二本鎖DNAを合成した。

(III) dCテイルの付加

この二本鎖DNAに60ユニットのヌクレアーゼS1(Bethesda Research Laboratories社)を50 μ lの反応液(0.1 M 酢酸ナトリウム,

pH 4.5, 0.25 M NaCl, 1.5 mM ZnSO₄)中で室温30分間作用させ、フェノールで除蛋白し、エタノールでDNAを沈降させた後、これに30ユニットのターミナルトランスフェラーゼ(Bethesda Research Laboratories社)を50 μ lの反応液(0.14 M カコジル酸カリウム, 0.3 M Tris (塩基), pH 7.6, 2 mM ジチオスレイトール, 1 mM CdCl₂, 0.15 mM dCTP)中で3分間37℃で作用させ二本鎖DNAの3'末端に約20個のデオキシシチジン鎖を伸長させた。これらの一連の反応で約300 ngのデオキシシチジン鎖をもった二本鎖DNAを得た。

(IV) 大腸菌プラスミドの開裂ならびにdGテイルの付加

一方、10 μ gの大腸菌プラスミドpHR322 DNAに20ユニットの制限酵素Pst Iを50 μ lの反応液(50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-メルカプトエタノール, 100 μ g/ml 牛血清アルブミン)中で3時間37℃で作用させてpHR322 DNA中に

1ヶ所存在するPstI認識部位を切断し、フェノールで除蛋白した後、30ユニットのターミナルトランスフェラーゼを5.0 μ gの反応液(0.14 M カコジル酸カリウム、0.3 M Tris(塩基)、pH 7.6、2 mM ジチオスレイトール、1 mM CaCl_2 、0.15 mM dGTP)中で3分間37℃で作用させ上記プラスミドpBR322 DNAの3'末端に約8個のデオキシグアニン鎖を延長させた。

(v) cDNAと大腸菌プラスミドとの会合ならびに大腸菌の形質変換

このようにして得られた合成二本鎖DNA 0.1 μ gと上記プラスミドpBR322 0.5 μ gを0.1 M NaCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.6、1 mM EDTAよりなる溶液中で65℃2分間、45℃2分間加熱しその後徐冷して会合させ、Eneaらの方法(J. Mol. Biol. 96, 495 (1975))に従って大腸菌X1776を形質転換させた。

(vi) cDNA含有プラスミドの単離

こうして1445のテトラサイクリン耐性株が単離され、これら各々のDNAをニトロセルロー

ファイによって、プローブに反応するコロニー9個を単離し、それぞれpGET 1~9と名づけた。

これらの菌株の各々の菌体からプラスミドDNAをBirnboim-Dolyの方法(Birnboim H. C. & Doly, J. Nucleic Acid Res., 7, 1513 (1979))によって単離した。次にプラスミドDNAの挿入部を制限酵素PstIにより切り出し、分離したプラスミドのうちでその挿入部の長さの最も長い断片を含むもの(pGET2 DNA)をえらんだ。

このプラスミド中に挿入されたcDNAの制限酵素地図を第3図に示す。次にこのpGET2プラスミド中に挿入されたcDNA配列の一次構造(ヌクレオチド配列)をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法とMaxam-Gilbertの方法によって決定した。そのヌクレオチド配列は第4図の通りであった。ここで、第4図においてヌクレオチド配列18-1502として示されるポリヌクレオチドは第1図で示されるポリヌクレオチドに対応する。

このヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、読み取り枠を一致させることによ

スフィルターの上に固定した。(Grunstein M. and Hogness, D. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1975))

一方、ヒトIgE H鎖のポリペプチドに対応した遺伝子断片(前出)をニクトランスレーション法(前出)を用いて ^{32}P ラベルした。

DNA 0.2 μ gを25 μ gの反応液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -メルカプトエタノール, 10 μCi α - ^{32}P -dATP 0.4 ng ウシ肝臓DNase I (Warrington))中2分間室温で反応させた。次に25ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼI (Boehringer Mannheim 社)を加えて30分間15℃で反応させた後、フェノール抽出、エタノール沈降によりDNAを精製し、均一に ^{32}P ラベルされたDNAを得た。

この ^{32}P -DNAをプローブとしてIaenらの方法(Nucleic Acids Res., 9, 6103 (1981))に従って上記のニトロセルローソフィルター上に固定したDNAに会合させ、オートラジオグラ

フィ、Dorringtonらの報告(Immunological Rev., 41, 3 (1978))しているIgE H鎖ポリペプチドのアミノ酸配列とはほぼ一致することから、pGET2に挿入されたcDNAはIgE H鎖のポリペプチドをコードしていることが確認された。このcDNAはDorringtonらの報告(前出)のIgE H鎖のV領域の63番目のアミノ酸をコードするコドンより始っており、C領域はすべてコードしている。さらに、ポリ(A)構造が存在していることから、非コード領域を含めて、mRNAの3'末端側の構造をすべて保持していると考えられる。

従って、このプラスミドに挿入されたヌクレオチド配列に翻訳開始コドンATGを読み取り枠が一致するように5'末端に加えて、他の発現用プラスミドに組み込み、これで大腸菌などを形質転換させることによりヒトIgEの抗原性を担っているC領域のポリペプチドを生産することができる。

実施例2

実施例1で得たプラスミドpGET2の挿入部を制限酵素PstIで切り出した。このDNA断片2

μg に 60 μl 反応液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.6 M NaCl, 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中で 2 unit のヌクレアーゼ Bal 31 (New England Biolabs 社 Gray ら Nucleic Acid Research, 2, 1459 (1975)) を 30℃ 1 分間作用させ DNA 断片の両端より部分的に消化した。

反応物よりフェノール抽出、エタノール沈降により DNA を精製したのち、制限開始コドンおよび制限酵素 Cla I の認識部位を含むアダプター 5' CATCGATG^{DNA}3' を T4 リガーゼ (New England Biolabs 社) を用いて結合させた。

一方、発現用プラスミドとして大腸菌の trp プロモーター部分 (プロモーター、オペレーターを含む 276 bp の DNA 断片、Bennett, G. N. ら, J. Mol. Biol., 121, 113 (1978)) を含むプラスミド ptrp 771 (ベクターは pBR322) を昭和 57 年特許第 57-85280 号に記載されている方法に従って構築した。

この発現プラスミド ptrp 771 を制限酵素

トリトン X 100, 1% 牛血清アルブミン) で洗浄し、さらに ¹²⁵I ラベルされたプロテイン A (英国 RCC Amersham 社) を反応させた。反応後口紙をよく洗ったのち、オートラジオグラフィーをとった。

このアッセイで抗ヒト IgE 抗体と最も強く反応したコロニーに含まれるプラスミドを pGET trp 104 と名づけ、このプラスミドを菌体より Birnboim-Doly の方法 (前出) を用いて抽出した。この pGET trp 104 におけるヒト IgE H 鎖をコードするポリヌクレオチドの ptrp 771 への挿入部分のヌクレオチド配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法 (前出) により検討したところ、制限開始コドン ATG に続いて、Dorring-ton の報告の 92 番目のアミノ酸をコードするコドンより読み取り枠が一致して、ヒト IgE H 鎖のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが連結されており、3' 末端側に、mRNA 構造の末端にあるポリ (A) 構造が保存されていることが明らかとなった (第 4 図)。

Cla I で切断し、この部分と同じく Cla I で切断した上記 pGET 2 挿入 DNA-アダプター結合物を、T4^{DNA} リガーゼを用いて挿入した。(第 5 図) この反応物を用いて Cohen らの方法 (前出) に従って大腸菌 294 を形質転換させ、ヌクレアーゼ Bal 31 による消化領域の異ったプラスミドを含む多くのコロニーを得た。

得られたコロニーに対して、抗ヒト IgE 抗体を用いてコロニーイムノアッセイ法 (H. J. Kemp と A. F. Cowman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4250 (1981)) を行い、ヒト IgE H 鎖のポリペプチドを産生しているコロニーを選別した。すなわち、ニトロセルロースフィルター上に生やしたコロニーを、0.1 M NaHCO₃, 0.1% トリトン X 100, 200 μg/ml リゾチーム溶液上で溶解したのち、そのまま臭化シアンで活性化した口紙 (Whatman 社, No. 540) 上に移し、口紙に固定化した。この口紙にヤギ抗ヒト IgE 抗体 (Miles 社製) を反応させた後、洗浄緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 0.1%

実施例 3

(1) 実施例 1 で得たプラスミド pGET 2 の挿入部を制限酵素 Pst I で切り出した。この DNA 断片をさらに制限酵素 Sal I で切断し、一端が Sal I 部位、他端が Pst I 部位をもつ約 1150 bp の DNA 断片を得た。この DNA 断片の Sal I 部位の一本鎖末端 DNA 末端を大腸菌 DNA ポリメラーゼ I ラージフラグメントでうめた後、制限開始コドンおよび制限酵素 Cla I の認識部位を含むアダプター 5' GCATCGATG^{DNA}3' を T4^{DNA} リガーゼ (New England Biolabs 社) を用いて結合させた。この結合物を制限酵素 Cla I で切断し、制限酵素 Cla I, Pst I で切断した発現プラスミド ptrp 771 と、T4 DNA リガーゼを用いて結合させた (第 6 図)。これら一連の反応により、trp プロモーターの下流に制限開始コドンおよび新たに作成された len をコードするコドン CTC を有し、読み取り枠を一致させて、ヒト IgE H 鎖のポリペプチドが、Dorring-ton の報告による 218 番目のアミノ酸をコードする

コドンより始まる、ヒト IgE H鎖のポリペプチド発現プラスミド pGET trp 302 を構築した。このプラスミドを用いて、Cohenらの方法に従って大腸菌 294 を形質転換させることにより、求めるプラスミド pGET trp 302 を含む菌株を得た。

(II) 実施例 1 で得たプラスミド pGET 2 の挿入部を制限酵素 Pst I で切り出し、この DNA 断片をさらに制限酵素 Hinf I で切断し、一端が Hinf I 部位、他端が Pst I 部位である約 810 bp の DNA 断片を得た。

この DNA 断片の Hinf I 部位の一本鎖接合 DNA 末端を大腸菌 DNA ポリメラーゼ I ラージフラグメント (Bethesda Research Laboratories 社) でうめ平滑末端とした後、実施例 3 (I) で用いたアダプター ^{DNA} 5' GCATCGATGC 3' を T4 リガーゼを用いて結合させた。

この結合物を制限酵素 Cla I で切断し、制限酵素 Cla I, Pst I で切断した発現プラスミド ptrp 771 と T4 リガーゼを用いて結合させた (第 6

／ml リゾチーム) に懸濁し、0℃ にて 45 分、37℃ にて 2 分放熱して溶融させた。これをさらに軽く (30 秒) 超音波処理を行って、溶出した菌体の DNA を切断した後、4℃ で 15000 rpm (サバール SS 34 ローター)、30 分間の遠心分離操作によって上澄み液を得た。この上澄み液の IgE 活性を IgE 測定キット (IgE テスト、シオノギ、塩野製薬) を用いた RIST 法 (Radio Immuno sorbent test, Immunology, 14, 265 (1968)) により定量した。

結果を第 2 表に示した。ヒト IgE H鎖のポリペプチドの産生量は pGET trp 302 を含む菌株が最も多く 480 ^{ng} / ml 抽出液であった。

第 2 表

組換え体	IgE H鎖産生量 (ng/ml 抽出液)
大腸菌 294 (ptrp 771)	0
大腸菌 294 (pGET trp 104)	84
大腸菌 294 (pGET trp 302)	480
大腸菌 294 (pGET trp 410)	48

図)。これら一連の反応により、trp プロモーターの下流に、翻訳開始コドンおよび His をコードするコドン C A T を有し、読み取り枠が一致して、ヒト IgE H鎖のポリペプチドが、Dorrington の報告による 331 番目のアミノ酸をコードするコドンより始まるヒト IgE H鎖のポリペプチド発現プラスミド pGET trp 410 を構築した。このプラスミドを用いて Cohen らの方法に従って大腸菌 294 を形質転換させることにより、求めるプラスミド pGET trp 410 を含む菌株を得た。

実施例 4

実施例 2, 3 で得られた IgE H鎖発現プラスミドを含む菌株を 20 ml の 1% グルコース、0.4% カザミノ酸を含む M9 培地で 37℃ 4 時間培養した後、インドールアクリル酸を 30 μ g/ml に加え、さらに 37℃ 3 時間培養した。菌体を集め、食塩水で洗ったのち、0.5 ml の溶出液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA 0.2 M NaCl, 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド, 0.02% トリトン X 100, 0.1 M

実施例 5

昭和 56 年特許第 56-19324 号特許例 2 に記載されている方法により抗ヒト IgE モノクローナル抗体を水不溶性担体アフィゲル 10 (Bio-Rad 社) に結合させた。抗ヒト IgE モノクローナル抗体-アフィゲル 10 カラム 1 ml に実施例 4 で得られた pGET trp 302 を含む菌体抽出液 5 ml をかけ、20% デキストロースを含む PBS (20 mM リン酸緩衝液, pH 6.8, 0.15 M NaCl) 50 ml を用いてカラムを洗浄したのち、0.2 M 酢酸, 0.15 M HCl 溶液 5 ml を用いて、カラムに吸着したヒト IgE H鎖をカラムから溶出し、溶出液をただちに中和したのち、PBS 1 l に対して 5℃ で 24 時間透析した。この操作により純度 80% 以上のヒト IgE H鎖のポリペプチドが約 50% の回収率で得られた。

4 図面の簡単な説明

第 1 図はヒト IgE H鎖のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、第 2 図は第 1 図に示されるヌクレオチド配列に対応するアミノ酸配列

を、第3図は実施例1で得られたpG E T 2中の
cDNAの制限酵素地図を、第4図はその一次構造
(ヌクレオチド配列)を示す。第5図は実施例2
の制限図を、第6図は実施例3の制限図を表し、
//// 部分はヒト I g E H 鎖のポリペプチドを
コードする部分を示す。

代理人 弁護士 天 井 作 次



第1図-(1)

	10	20	30	40	50		
	AGATTT	CALGGC	AGGGTC	ACCATG	ACCAGAG	ACGGTCCTTCAGTACAGC	50
	TCTAAG	TCCCGT	CCCAGT	GGTACT	GGTCTCT	GCCGAGGAAGTCATGTCC	
	CTACAT	GGACCT	GAGAAG	CTGAGAT	CTGACGAC	TCCGCCGTGTTTACT	100
	GATGTAC	CTGGACT	CTTCAGAC	CTAGACT	CTGAGCCG	GACAAATGA	
	GTGCGA	AAAGTG	ACCTTT	TGGAGT	GATTATT	AACCTTCACTACTCG	150
	CACGCT	TTTCACT	GGGAAA	ACCTCA	CTAATA	ATTGAACTGATGAGC	
	TACACT	TTGGAC	CTCTGG	GGCCAA	GGGACC	ACGGTCACCGTCTCCTCAGC	200
	ATGTGA	AAACCT	GCAGAC	CCCCGG	TTCCCT	GGTGCCAGTGCCAGAGGAGTCC	
	CTCCAC	ACAGAC	CCCATC	CTCTCC	CTTGAC	CCGCTGCTGCAAAAACA	250
	GAGGTG	TGTCTC	GGGTAG	GCAGAG	GGGAAC	TGGCCGACGACGTTTTTGT	
	TTCCCT	TCCAAT	GCCACCT	CCGTGAC	TCTGGG	CTGCGTCCGACGGGCTAC	300
	AAGGGAG	GTACGG	TGGAGG	CACTGAG	ACCCGAC	GGGACCGGTGCCCGATC	
	TTCCCG	GAGCCG	GTGCTG	ACCTGG	GACACAG	GCTCCCTCAACGGGAC	350
	AAGGGCT	TCGCCA	CTACCA	CTGGAC	CCCTGT	GTCGGAGGAGTTGCCCTG	
	AACTAT	GACCTT	ACCAGC	ACCACC	CTCAGG	CTCTCTGCTCACTATGCCA	400
	TTGATA	CTGGAAT	GCTGGT	GCTGGG	AGTGGC	GAGACCACTGATACGGT	
	CCATCAG	CTTGTG	CTGACCG	TCTCGG	GTGCGG	CAAGCAGATGTTACCC	450
	GGTAGT	CGAAGC	ACTGGC	AGAGCC	ACCCAG	CCGGTTCGTCTACAAGTGG	
	TGCCGT	GTCGAC	ACACTC	CATCGT	CCACAG	ACTGGGTCGACAAACAAAC	500
	ACGGCA	CACCGT	GTGTG	GAGGTAG	CAGGTG	CTGACCCAGCTGTTGTTTTG	

第1図-(2)

10	20	30	40	50	
CTTCAGCGTCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCCACCGTGAAGATCTTAC					550
GAACTCCGACAGCAGGTCCTCTGAAGTGGGGCGGTGGCACTTCTAGAATG					
AGTCGTCTCTGCGACGGGGCGGGCACTTCCCGCCGACCATCCAGCTCTTG					600
TCAGCAGGACCGTCCCGCGCCCGTGAAGGGGGCTGGTAGGTCCAGGAC					
TGCTCTCTCTCTGGGTACACCCAGGGCACTATCAACATCAGCTGGCTGGA					650
ACGGAGCAGACACCATCTGGGCTCCCTGATAGTTCTAGTGGACCGACCT					
GGACGGGCAGGTGATGGACGTGGACTTGTCCACCGCTCTACACGGAGG					700
CCTGCCCGTCCAGTACCTGACCTGAACAGGTGGCGAGATGGTGGTCC					
AGGCTCAGGTGGCTCCACACAAAGCGAGCTACCCCTCAGCCAGAACGAC					750
TCCCACTCGACCGGAGGTGTGTTTCCGTCCAGTGGGAGTGGGTCTTGGTG					
TGGCTGTGACACCGCACTACACCTGCCAGGTACCTATCAAGCTCACAC					800
ACCGACAGTCTGGCGTGGATGTGGACGGTCCAGTGGATAGTTCCAGTGTG					
CTTTGAGGACAGCACCAGAAAGTGTGCAGATTCCAAACCGAGAGGGCTGA					850
GAAACTCTCTGTCGTTCTTCACACGCTTAAGTTGGGCTCTCCCACT					
GGCGCTACCTAAGCGGGCCAGCCGCTTCCAGCTGTTCATCCGCAAGTGG					900
CGCGGATGCAITCGGGCGGGTCGGCAAGCTGGACAACTAGGCGTTTCAAC					
CCACAGTACCTGTCTGTGGTGGACCTGGACCCAGCAAGGGGACCGT					950
GGGTGTAGTGGACAGACCAACACCTGGACCGTGGGTCTTCCCTGGCA					
GAACCTGACCTGGTCCCGGGCACTGGGAAGCTGTGAACCACTCCACCA					1000
CTTGCACCTGGAACAGGGCCCGTCAACCTTCGGACACTTGGTGAGGTGGT					

第1図-(3)

10	20	30	40	50	
GAAAGGAGGAGAAAGACGCLAAATGGACGTTAACCGTCACGTCCACCTG					1050
CTTTCTCTCTCTGCTCGCTTACCGTGAATTGGCAGTGCAGGTGGGAC					
CCGTGGGCACCCGACCTGGATCGAGGGGGAGACCTACCACTGCAGGGT					1100
GGCCACCGTGGGCTTGACCTAGCTCCCGCTCTGGATGGTCAGTCCCA					
GACCCACCCACCTGCCAGGGCCCTCATGCGGTCCAGGACCAAGACCA					1150
CTGGGTGGGGTGGAGGGGTCCCGGGAGTACGGCAGGTGCTGGTTCTGGT					
GGGCGCGCGCTGCTGCCCGGAAGTCTATGCGTTTGGCAGCGCGGAGTGG					1200
CGCGGGCGGACGACGGGGCTTCAGATACGGAAGCTGCGGGCTCACC					
CCGGGGAGCGGGGACAAGCGCACCTCGCCTGCCTGATCCAGAACTTCAT					1250
GGCCCTCTCGCCCTGTTCCGTGGGAGCGGACGGACTAGGTCTTGAAGTA					
GCCTGAGGACATCTCGGTCCAGTGGCTGCACAACGAGGTGCAGCTCCCGG					1300
CGGACTCTGTAGAGCCACGTACCCGACGTGTGTCTCCAGTCCAGGGCC					
ACGCCCGGCACAGCACGACGACGCCCGCAAGACCAAGGGCTCCGGCTTC					1350
TGCGGGCGGTGTCTGTGCTCGGTCGGGGCGTTCTGGTTCCCGAGCGCGAAG					
TTCTCTTCAAGCGCGCTGGAGGTGACCAGCGCGCAATGGGAGCACAAAGA					1400
AAGCAGAACTCGGGCGACCTCCAGTGGTCCCGCTTACCTCTGCTTTCT					
TEAGTTTATCTGCCGTGCACTCCATGAGGCAAGCGAGCCCTCACAGACCG					1450
ACTCAAGTAGACGGCAGGTACGTACTCCGTCCGTCCGGGAGTGTCTGGC					
TCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGCTAAATGA					
AGGTCCGTCCACAGACATTTAGGGCCATTTACT					

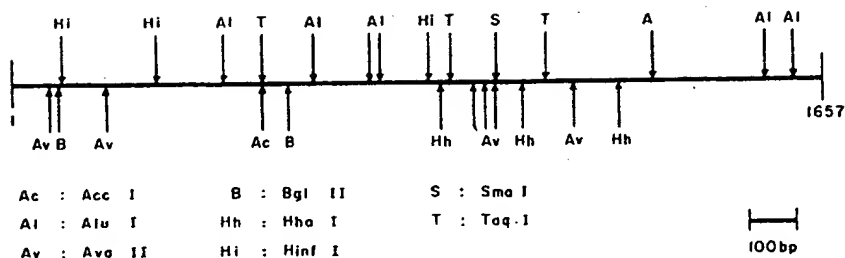
第2図—(1)

ARG PHE GLN GLY ARG VAL THR MET THR ARG ASP ALA SER PHE SER
 THR ALA TYR MET ASP LEU ARG SER LEU ARG SER ASP ASP SER ALA
 VAL PHE TYR CYS ALA LYS SER ASP PRO PHE TRP SER ASP TYR TYR
 ASN PHE ASP TYR SER TYR THR LEU ASP VAL TRP GLY GLN GLY THR
 THR VAL THR VAL SER SER ALA SER THR GLN SER PRO SER VAL PHE
 PRO LEU THR ARG CYS CYS LYS ASN ILE PRO SER ASN ALA THR SER
 VAL THR LEU GLY CYS LEU ALA THR GLY TYR PHE PRO GLU PRO VAL
 MET VAL THR TRP ASP THR GLY SER LEU ASN GLY THR THR MET THR
 LEU PRO ALA THR THR LEU THR LEU SER GLY HIS TYR ALA THR ILE
 SER LEU LEU THR VAL SER GLY ALA TRP ALA LYS GLN MET PHE THR
 CYS ARG VAL ALA HIS THR PRO SER SER THR ASP TRP VAL ASP ASN
 LYS THR PHE SER VAL CYS SER ARG ASP PHE THR PRO PRO THR VAL
 LYS ILE LEU GLN SER SER CYS ASP GLY GLY GLY HIS PHE PRO PRO
 THR ILE GLN LEU LEU CYS LEU VAL SER GLY TYR THR PRO GLY THR
 ILE ASN ILE THR TRP LEU GLU ASP GLY GLN VAL MET ASP VAL ASP
 LEU SER THR ALA SER THR THR GLN GLU GLY GLU LEU ALA SER THR
 GLN SER GLU LEU THR LEU SER GLN LYS HIS TRP LEU SER ASP ARG
 THR TYR THR CYS GLN VAL THR TYR GLN GLY HIS THR PHE GLU ASP
 SER THR LYS LYS CYS ALA ASP SER ASN PRO ARG GLY VAL SER ALA
 TYR LEU SER ARG PRO SER PRO PHE ASP LEU PHE ILE ARG LYS SER
 PRO THR ILE THR CYS LEU VAL VAL ASP LEU ALA PRO SER LYS GLY

第2図—(2)

THR VAL ASN LEU THR TRP SER ARG ALA SER GLY LYS PRO VAL ASN
 HIS SER THR ARG LYS GLU GLU LYS GLN ARG ASN GLY THR LEU THR
 VAL THR SER THR LEU PRO VAL GLY THR ARG ASP TRP ILE GLU GLY
 GLU THR TYR GLN CYS ARG VAL THR HIS PRO HIS LEU PRO ARG ALA
 LEU MET ARG SER THR THR LYS THR SER GLY PRO ARG ALA ALA PRO
 GLU VAL TYR ALA PHE ALA THR PRO GLU TRP PRO GLY SER ARG ASP
 LYS ARG THR LEU ALA CYS LEU ILE GLN ASN PHE MET PRO GLU ASP
 ILE SER VAL GLN TRP LEU HIS ASN GLU VAL GLN LEU PRO ASP ALA
 ARG HIS SER THR THR GLN PRO ARG LYS THR LYS GLY SER GLY PHE
 PHE VAL PHE SER ARG LEU GLU VAL THR ARG ALA GLU TRP GLU GLN
 LYS ASP GLU PHE ILE CYS ARG ALA VAL HIS GLU ALA ALA SER PRO
 SER GLN THR VAL GLN ARG ALA VAL SER VAL ASN PRO GLY LYS -

第 3 図



第 4 図—(1)

	10	20	30	40	50	
GGGGGGGGGGGGGGGAGATTTGAGGGGAGGGTCACCATGACGAGAC						50
CCCCCCCCCCCCCGCTCTAAAGTCCCGTCCAGTGGTACTGGTCTCTG						
GGTCCCTTCAGTACAGCCCTACATGGACCTGAGAAGTCTGAGATCTGACGA						100
CGCAGGAAGTCATGTCGGATGTACCTGGACTCTTCAGACTCTAGACTGCT						
CTCGGCCGTGTTTTACTGTGGAAAAGTCACCCTTTTTGGAGTGATTATT						150
GAGCGGGCAGAAATGACACGCTTTTCACTGGGAAAACCTCACTAATAA						
ATAACTTTGACTACTCGTACACTTTGGAGCTCTGGGGCCAGGGACACG						200
TATGAAACTGATGAGCATGTGAACCTGCAGACCCCGTTCCCTGCTGC						
GTACCCGTCTCCTCAGCCTCCACACAGAGCCCATCCGTCTTCCCTTGAC						250
CAGTGGCAGAGGAGTGGGAGGTGTGTCTCGGGTAGGCAGAGGGGAAGTG						
CCGCTGCTGCAAAAADATTCCTCCAAATGCCACCTCCGTGACTCTGGCT						300
GGGACGACGTTTTTTGTAAGGGAGGTTACGGTGGAGGCACTGAGACCGA						
GGCTGGCCACGGGCTACTTCCCGAGCCGGTGTGCTGAGTGGGACACA						350
CGGACCGGTGCCGATGAAGGGCTCGGGCACTACCAATGACCCGTGTGT						
GGTCCCTCAACGGGACAACTATGAUCTTACCAGCCACCCCTCAGCT						400
CCGAGGGAGTTGCCCTTTGATACTGCAATGCTGGTGGTGGGAGTCCGA						
CTCTGGTCACTATGCCACCATCAGCTTGTGACCGTCTCGGGTGGTGGG						450
GAGACCACTGATACGGTGGTAGTCGAATGACTGGCAGAGCCACGACCC						
CCAAGCAGATGTTCACTGCCGTGTGGCACACACTCCATCGTCCACAGAC						500
GGTTGCTCTACAGTGGACGGACACCGTGTGTGAGGTAGCAGGTCTCTG						

第4図-(2)

10	20	30	40	50	
TGGGTCGACAAACAAACCTTCAGCGTCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCC					550
ACCCAGCTCTTCTTTTGGAACTCGCAGACGAGCTCCCTGAAGTGGGGCG					
CACCGTGAAGATCTTACAGTCCTCCTGCGACGGCGCGGGCAGCTTCCCC					600
GTGGCACTTCTAGAACTCAGCAGGACGCTGCGCGCGCGCGTGAAGGGG					
CGACCATCCAGCTCCTGTCCCTGCTCTCTGGGTACACCCAGGGACTATC					650
GCTGGTAGCTCGAGGACCGGAGCAGACCCATGTGGGGTCCCTGATAG					
AACATCACCTGGCTGAGGACGGGCGAGTGCATGACCTGGACTTGTCCAC					700
TTGTAGTGGACCGACCTCCTGCCCGTCCAGTACCTGCCCTGAACAGGTG					
CGCCTCTACCCAGGAGGGTGAGCTGGCCTCCACACAAGCGAGCTCA					750
GCGGAGATGGTGGCTCCTCCCACTCGACCGGAGGTGTGTTTGGCTCGAGT					
CCCTCAGCCAGAAAGCACTGGCTGTGACAGCCGACCTACACCTGCCAGCTC					800
GGGAGTGGCTCTTCTGACCCAGCTCTGGCGTGGATGTGGACGGTCCAG					
ACCTATCAAGGTCAACCTTTGAGGACAGCACAAGAGTGTGCAGATTC					850
TGGATAGTTCCAGTGTGGAACTCCTGTCTGTGTTCTTACACCTCTAAG					
CAACCCGAGAGGGGTGAGCGCTACCTAAGCCGCGCCAGCCGTTCCAGC					900
GTGGGCTCTCCCACTCGCGGATGGATTGGCCGCGGTGGGGCAAGTGG					
TGTTCAATCCCAAGTCCCAACGATCAGCTGTCTGTGGTGGGACCTGGCA					950
ACAAGTAGCGGTTACGCGGTTGCTAGTGGACAGACCAACCTTGGACCT					
GGCAGCAGCGGACCTGAACTGACCTGGTCCCGGGCACTGGGAAGCC					1000
GGGTGCTTCCCTGGGCACTTGGACTGGACAGGGCGGGTCAACCTTCGG					

第4図-(3)

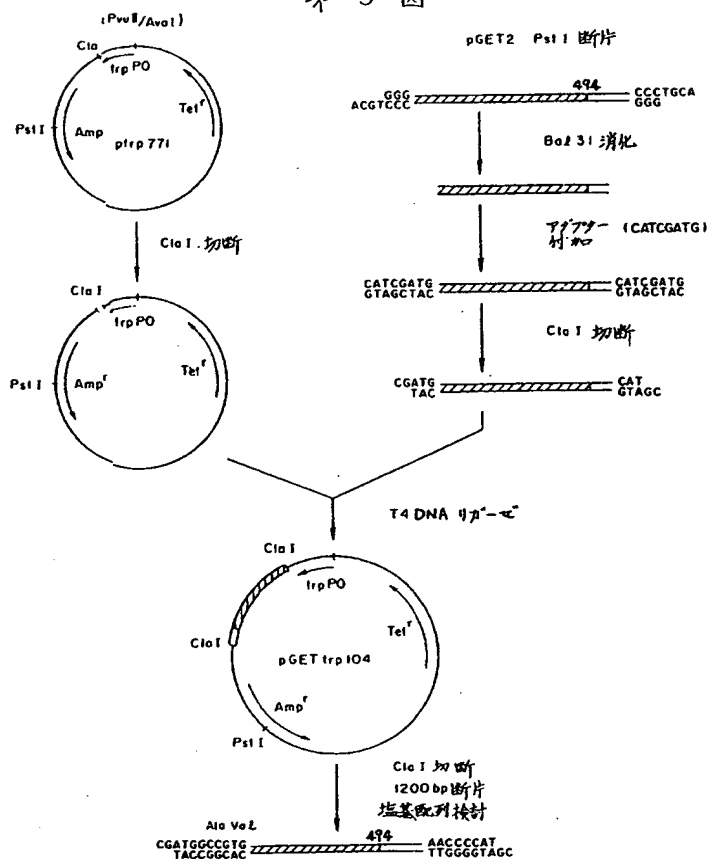
10	20	30	40	50	
TGTGAACCACTCCACAGAAAGCAGCAGAGCAGCCCAATGGCAGCTTAA					1050
ACACTTGGTGAAGTGGCTCTTTCCCTCCTCTTCTGCGGTTACCGTGAATT					
CCCTCAGCTCCACCTGCGCGTGGGCAACCCGAGACTGGATCGAGGGGGAG					1100
GGCAGTGCAGGTGGGACGGCCACCCGTGGGCTCTGACCTAGCTCCCGCTC					
ACCTACCACTCCAGGCTGACCCACCCCACTTGCCTAGGGCCCTCATGG					1150
TGGATGCTCAGTCCCACTGGGTGGGGTGGACGGTCCCGGGAGTACGC					
GTCACGACCAAGACCAAGCGCGCGGTGCTGCCCGGAAGTCTATGGCT					1200
CAGGTGCTGTTCTGGTGGCGGGCGGACGAGGGGCTTCAGATACGCA					
TTGGCAGCGCGGAGTGGCGGGGAGCGGGACAAAGCGCACCTCGCCTGC					1250
AACGCTGGGGCTCACCGGGCCCTCGGCCCTGTTCCGCTGGGAGCGGACG					
CTGATCCAGAACTTCATGCTTACGACATCTCGCTGCAGTGGCTGCACAA					1300
GACTAGGCTCTTGAAGTACGGACTCCTGTAGAGCCAGTCAACCGACGTCT					
CGAGGTGCAGCTCCCGGACGCGCGGACAGCAGCAGCGCCCGCAAGA					1350
GCTCCAGCTCGAGGGCTGCGGGCGGTGTCTGTGCTGCTCGGGCGCTCT					
CCAGGGCTCCGGCTTCTTCTCTTTCAGCCGCTGGAGGTGACCGGCGC					1400
GGTTCCCGAGCGGAGGAGCAGAGTCCGCGGACCTCCACTGCTCCCGG					
CAATGGGACGAGAGATGAGTTTCACTGCGCGTGCAGTCCATGAGGAGC					1450
CTTACCTCGCTTTCTACTCAAGTAGACCGACGTCAGGTACTCCGTCG					
GAGCCCTCACAGACCTCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGTAAAT					1500
CTCGGGAGTGTCTCCAGGTCGCTCGCCACAGACATTAGCGCCATTTA					

第4図-(4)

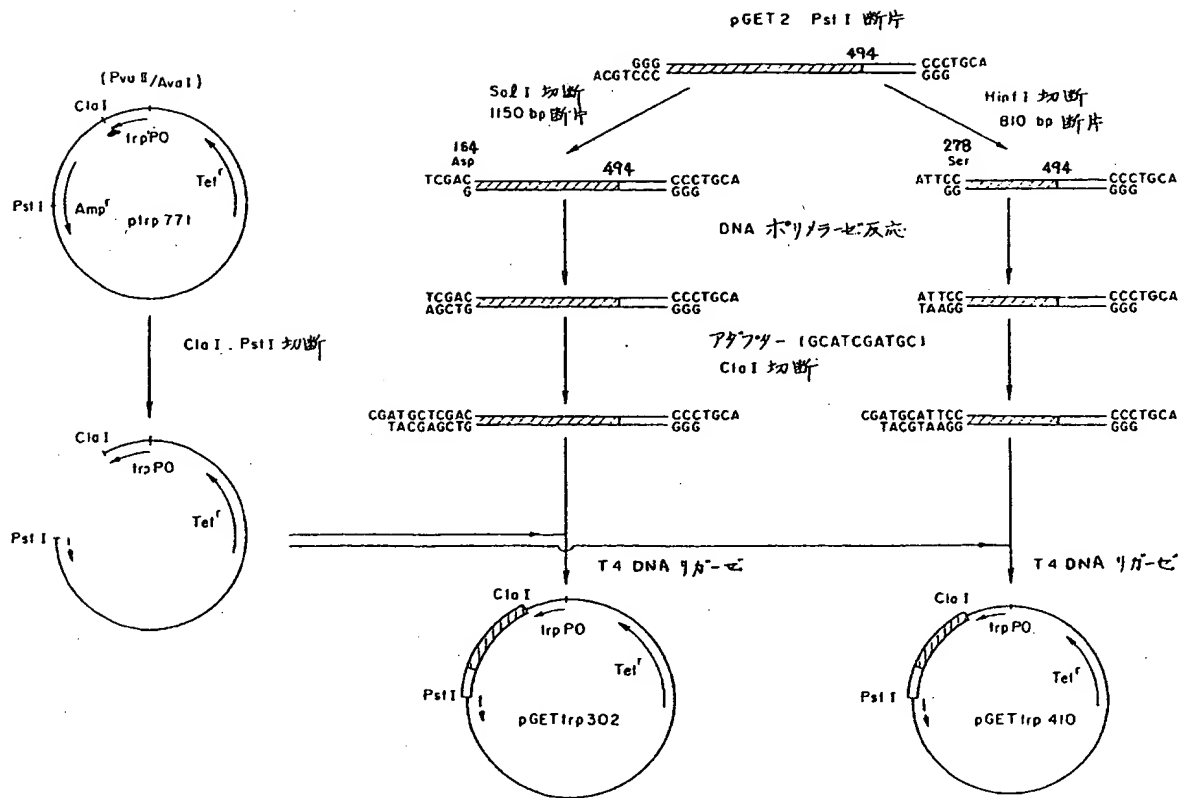
10	20	30	40	50	
GACGTA	CTCCTG	CCCTCC	CCAGGG	CTCCAT	CCAGCTGTGCAGTG
CTGCAT	GAGGAC	GGAGGG	GAGGGT	CCCGAG	GTTAGGTCGACACGTCAC
1559					
GGGAGG	ACTGCC	AGACCT	TCTGTCC	ACTGTTG	CAATGACCCAGGAAGC
CCCTCCT	GACCGG	CTGGAG	ACAGGT	GACAACG	TACTGCGGTCCTTCG
1600					
TACCCCA	ATAACT	GTGCCT	GTCTCAG	AAAAAAAA	AAAAAAAAACCCCCC
ATGGGGG	TTATTT	GACACG	GACGAG	CTTTTTT	TTTTTTTTTTTGGGGGG
1650					
CCCCCCC					
GGGGGGG					
TOTAL NUMBER OF NUCLEOTIDE PAIRS =					1657

代理人 弁理士 天井作次

第5図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑦発明者 黒川勉

川西市水明台 1 丁目 1 番地の 50

⑧発明者 音田治夫

川西市多田院字順松 21 番地の 6

13 10 1987
AD
48
(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true
copy of the following application as filed with this
office.

Date of Application : September 7, 1982

Application Number : No. 156285 of 1982

Applicant(s) : Takeda Chemical Industries, Ltd.

July 29 , 1983

Director-General,

Patent Office
Kazuo Wakasugi

Certificate No. Sho 58-21893

15 12 82

Application for Patent
(Patent application under the proviso
of Art. 38 of the Patent Law)

The 7th day of September
The 57th year of Showa (1982)

To: Director-General of the Patent Office

1. Title of Invention:

Novel DNA

2. Number of the Inventions stated in Extent of Claim
for Patent: 4

3. Inventor(s):

Address: 4-16, Higashitokiwadai 7-chome, Toyono-cho,
Toyono-gun, Osaka

Name : Masakazu Kikuchi
[with 2 co-inventors]

4. Applicant:

Address: 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka

Name : (293) Takeda Chemical Industries, Ltd.
Ikushiro Kurabayashi, representative

5. Agent :

Postal Zone Number: 532

Address: c/o Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka

Name : (6022) Sakuji Amai , Registered Patent Attorney
Tokyo Liaison Office (TOKKYOHOKIKA)
Telephone Number: 278-2219

6. List of annexed Documents:

(1) Specification	one set
(2) Drawings	one set
(3) Power of Attorney	one set
(4) Copy of this Application for Patent	one set

7. Inventors other than that described above:

Address: 1-50, Suimeidai 1-chome, Kawanishi,
Hyogo

Name : Tsutomu Kurokawa

Address: 21-6, Aza-junmatsu, Tada-in, Kawanishi,
Hyogo

Name : Haruo Onda

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

Novel DNA

2. Extent of Claim for Patent

- (1) A DNA which contains the polynucleotide of the nucleotide sequence 831-1485 as shown in Figure 1.
- (2) A DNA according to Claim 1, wherein the polynucleotide of the nucleotide sequence 490-830 as shown in Figure 1 or a fragment thereof is linked to the 5' end of the polynucleotide of the nucleotide sequence 831-1485 as shown in the same Figure.
- (3) A DNA according to Claim 2, wherein the polynucleotide of the nucleotide sequence 88-489 as shown in Figure 1 or a fragment thereof is linked to the 5' end.
- (4) A DNA according to Claim 3, wherein the polynucleotide of the nucleotide sequence 1-87 as shown in Figure 1 or a fragment thereof is linked to the 5' end.
- (5) A DNA according to any of Claims 1 to 4, wherein it has ATG at the 5' end without any reading frame shift.
- (6) A DNA according to Claim 1, which codes for the polypeptide of the amino acid sequence 278-494 as shown in Figure 2.
- (7) A DNA according to Claim 2, which codes for a polypeptide wherein the polypeptide of the amino acid sequence 164-277 as shown in Figure 2 or a fragment thereof is linked to the N terminus of the polypeptide of the amino acid sequence 278-494 as shown in the same Figure.
- (8) A DNA according to Claim 3, which codes for a polypeptide wherein the polypeptide of the amino acid sequence 30-163 as shown in Figure 2 or a fragment thereof is linked to the N terminus of the polypeptide as defined in Claim 7.
- (9) A DNA according to Claim 4, which codes for a polypeptide wherein the polypeptide of the amino acid sequence 1-29 as shown in Figure 2 or a fragment thereof is linked

to the N terminus of the polypeptide as defined in Claim 8.

(10) A DNA according to any of Claims 1 to 9, which codes for a polypeptide having Met at the N terminus thereof.

(11) A DNA according to any of Claims 1 to 10, which codes for a polypeptide equivalent in immunological or biological activities to the human immunoglobulin E H Chain.

(12) A DNA according to any of Claims 1 to 11, which forms part of a recombinant DNA molecule.

(13) A DNA according to any of Claims 1 to 12, which is linked downstream from a promoter.

(14) A DNA according to Claim 13, wherein the promoter is tryptophane promoter.

(15) A method of producing a DNA containing a polynucleotide of the nucleotide sequence 831-1485 as shown in Figure 1, which comprises reversely transcribing a mRNA coding for the human immunoglobulin E H Chain.

(16) A transformant which contains a DNA containing a polynucleotide of the nucleotide sequence 831-1485 as shown in Figure 1.

(17) A transformant according to Claim 16, which is Escherichia coli.

(18) A method of producing a polypeptide of or equivalent in immunological or biological activities to the human immunoglobulin E H chain, which comprises growing a transformant which contains a DNA containing a polynucleotide of the nucleotide sequence 831-1485 as shown in Figure 1, accumulating the polypeptide of or equivalent in immunological or biological activities to the human immunoglobulin E H chain and recovering the same.

3. Detailed Description of the Invention

This invention relates to a novel DNA. More particularly, this invention relates to a DNA containing a polynucleotide which codes for the human immunoglobulin E H-chain polypeptide, to a transformant carrying said DNA, and to a method for producing the human immunoglobulin E H-chain polypeptide by the cultivation of said transformant.

Immunoglobulins, which are present in animal body fluids and are closely associated with antibodies, consist of H (heavy) chains and L (light) chains. Each chain comprises the V region, which is determinative of the binding specificity with antigen, and the C region, which is determinative of the effector function. On the basis of the constituents of the H chains, immunoglobulins (Ig) are classified into 5 classes, namely A, D, G, M and E.

Among them, immunoglobulin E (hereinafter referred to as IgE), which constitutes reagin, has a molecular weight of 196,000 daltons and consists of two 75,000-dalton H chains and two 22,500-dalton L chains (in the case of human IgE), the chains being linked together by disulfide bond. The C region of the H chain of IgE comprises four sites, CH1 to CH4, and two H chains are linked together at CH2 by disulfide bonds. IgE is in charge of important biological reactions, such as allergic reactions. For instance, it is known that allergic reactions are induced by binding of specific antigen-bound IgE to sensitized mast cells or basophilic cells [K. Ishizaka and T. Ishizaka, Immunological Rev., 41, 109 (1978)]. Therefore, for the purpose of suppressing allergic reactions, the use of an IgE molecule having no antigen-binding site has been proposed. However, many problems remain unsolved with respect to a variety of in vivo reactions induced by IgE. One reason is that a sufficient quantity of human IgE cannot be supplied.

On the other hand, the anti-IgE antibody is an essential material in the diagnosis of allergic diseases and is demanded in very large quantity. For its production, however, the purified human IgE is required in large quantity. For this and other reasons, development of a technique capable of producing the human IgE on large scale and at low cost has been waited for.

In a so-far proposed method of producing IgE, the supernatant of a culture of human IgE-producing myeloma cells of an established line is treated for the separation of IgE followed by purification. However, said method involves cell culture and the cell growth rate is low. For these and other reasons, it is difficult to obtain a large quantity of IgE at low cost.

The present inventors have already succeeded in isolating a human IgE-encoding mRNA from cells (Japanese Patent Application No. 120,555/1981 filed July 30, 1981).

With the above mRNA, the present inventors continued their research with use of the technology of gene manipulation so that they could develop a technology of producing the human IgE H chain polypeptide by cloning the gene coding for the human IgE H chain polypeptide and introducing the thus-obtained recombinant DNA molecule into a host organism, and, as a result, they have completed the present invention.

Thus, the present invention provides a DNA which contains a polynucleotide coding for the human IgE H-chain polypeptide, a transformant carrying said DNA, and a method of producing the human IgE H-chain polypeptide or a polypeptide equivalent thereto in immunological or biological activities, which comprises growing the transformant carrying said DNA.

The DNA provided by the present invention is a DNA containing a polynucleotide having the nucleotide sequence shown in Figure 1.

Referring to Fig. 1, the polynucleotide of the

nucleotide sequence 831-1485 codes for a polypeptide of the amino acid sequence 278-494 as shown in Fig. 2. Thus, it codes for CH3-CH4 of the human IgE H-chain.

The polynucleotide of the nucleotide sequence 490-1485 as shown in Fig. 1 codes for a polypeptide of the amino acid sequence 164-494 as shown in Fig. 2, hence CH2-CH4 of the human IgE H-chain.

The polynucleotide of the nucleotide sequence 88-1485 as shown in Fig. 1 codes for a polypeptide of the amino acid sequence 30-494 as shown in Fig. 2. Said polypeptide covers the CH1-CH4 polypeptides of the human IgE H-chain.

Similarly, the polynucleotide of the nucleotide sequence 1-1485 as shown in Fig. 1 codes for a polypeptide of the amino acid sequence 1-494 as shown in Fig. 2. Said polypeptide includes the human IgE H-chain CH1-CH4 polypeptides.

For the direct expression, the above-mentioned polynucleotides may possess the codon ATG at the 5'-end thereof without reading frame shift. In that case, said polynucleotides code for polypeptides possessing Met at the N-terminus thereof.

The above-mentioned polynucleotides, with or without ATG at the 5'-end thereof without reading frame shift, are preferably linked at a site downstream from a promoter. The promoter includes, among others, the tryptophan synthesis (trp) promoter, rec A promoter and lactose promoter. Among these, the trp promoter is preferable.

Table 1 gives the definition of each symbol as used in the present specification, drawing and claims.

Table 1

DNA	= deoxyribonucleic acid
cDNA	= complementary deoxyribonucleic acid
RNA	= ribonucleic acid
mRNA	= messenger ribonucleic acid

A = deoxyadenylate
T = thymidylate
G = deoxyquanylate
C = deoxycytidylate
U = uridylate
dATP = deoxyadenosine triphosphate
dTTP = thymidine triphosphate
dGTP = deoxyguanosine triphosphate
dCTP = deoxycytidine triphosphate
ATP = adenosine triphosphate
EDTA = ethylenediamine tetraacetate
SDS = sodium dodecyl sulfate
Gly = glycine
Ala = alanine
Val = valine
Leu = leucine
Ile = isoleucine
Ser = serine
Thr = threonine
Cys = cysteine
Met = methionine
Glu = glutamic acid
Asp = aspartic acid
Lys = lysine
Arg = arginine
His = histidine
Phe = phenylalanine
Tyr = tyrosine
Trp = tryptophan
Pro = proline
Asn = asparagine
Gln = glutamine
bp = base pair(s)

In the present invention, a double-stranded DNA coding for the human IgE H-chain polypeptide can be produced by synthesizing a single-stranded cDNA using the mRNA coding for the human IgE H-chain polypeptide as produced by the method disclosed in Japanese Patent Application No. 120,555/1981 or a modification thereof as the template together with reverse transcriptase, for instance, then converting the cDNA to the double-stranded form, digesting the double-stranded DNA with an enzyme (exonuclease, endonuclease), adding an adapter to the digestion product, inserting the resulting product into a plasmid, introducing the plasmid into Escherichia coli, for instance, growing the thus-obtained transformant and isolating the cDNA-containing plasmid.

The mRNA to be used in the above process can be produced, for example, in the following manner.

Human myeloma cells of the established cell line U266, which are capable of producing human IgE, are cultivated, the proliferated cells are harvested by centrifugation, washed, for instance with physiological saline, and lysed in a denaturing solution, for instance N-laurylsarcosine buffer, with heparin, diethyl pyrocarbonate, etc. added, and an RNA fraction is collected in the conventional manner by, for example, layering the lysate onto 5.7 M CsCl solution followed by centrifugation and extraction with phenol. Then, polyadenylic acid-containing RNAs are separated using oligo(dT)-cellulose, poly(U)-Sephadex or the like. The subsequent sucrose density gradient centrifugation gives the mRNA.

Using the thus-obtained mRNA as the template, a single-stranded cDNA is synthesized by any method known per se with the use of reverse transcriptase, and the cDNA is further converted to the double-stranded form [Maniatis, T. et al., Cell, 8, 163 (1976)].

The double-stranded DNA is inserted into pBR 322 at the PstI or SphI restriction endonuclease cleavage site by, for example, the dG-dC or dA-dT homopolymer tailing method [Nelson, T. S., Methods in Enzymology, 68, 41

(1979), Academic Press Inc., New York]. Escherichia coli strain λ 1776, for instance, is transformed with the resulting recombinant plasmid. An adequate transformant can be selected on the basis of the tetracycline or ampicillin resistance.

The structural gene fragment for the human IgE H-chain has already been cloned [Nishida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3833 (1982)], and its base sequence has been partially analyzed. This gene fragment (gift from Prof. Tasuku Honjo of Osaka University, Faculty of Medicine) is labelled with ^{32}P by, for example, the nick translation method [Rigby, P. W. J. et al., J. Mol. Biol., 113, 237 (1977)] or, alternatively, an oligonucleotide having the nucleotide sequence supposedly corresponding to the amino acid sequence of the human IgE H-chain polypeptide is synthesized chemically and labelled with ^{32}P . With the labelled product as the probe, the desired clone is secondarily screened out from among the already obtained tetracycline- or ampicillin-resistant transformants by the per se known colony hybridization method [Grunstein, M. and Hogness, D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961 (1975)]. The nucleotide sequence of the clone which gives a positive result in the above colony hybridization is determined by, for example, the method of Maxam-Gilbert [Maxam, A. M. & Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 (1977)] or the dideoxynucleotide synthetic chain termination method using phage M13 [Messing, J. et al., Nucleic Acids Res., 9, 309 (1981)], whereby the presence of the gene coding for the human IgE H-chain polypeptide can be confirmed. Then, the human IgE H-chain polypeptide-encoding gene can be cut out wholly or partly from the clone obtained and can be linked at a site downstream from an adequate promoter, the SD (Shine and Dalgarno) sequence and the translation start codon ATG, for introduction into an adequate host organism. The gene or part thereof can also be inserted into within

an adequate structural gene (e.g. β -lactamase gene or anthranilate synthetase gene) as inserted in a plasmid. In that case, the expression product is a chimera polypeptide coupled with the whole or part of the structural gene product.

The promoter includes those mentioned hereinabove, and the host organism includes bacteria such as Escherichia coli and Bacillus subtilis, among which Escherichia coli (e.g. strain 294, strain W3110), particularly strain 294, is preferred.

The strain 294 is a known strain [Backman, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4174 (1976)] and has been deposited with the Institute for Fermentation, Osaka under deposit No. IFO-14171.

The transformation of a host organism with the DNA in the present invention is performed, for example, by the known method [Cohen, S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)].

The thus-obtained transformant is cultivated in a per se known medium.

The medium is, for example, glucose- and Casamino acids-containing M9 medium [Miller, J., Experiments in Molecular Genetics, 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972)]. An agent such as 3 β -indolylacrylic acid may be added as necessary for increased promoter efficiency.

The cultivation is generally conducted at 15-43°C for 3 to 24 hours. Aeration and/or stirring may be made as necessary.

After cultivation, cells are harvested by the known method and, for instance after suspending in a buffer, destructed by, for example, treatment with lysozyme or a surface active agent or ultrasonic treatment, followed by centrifugation to give a supernatant.

The human IgE H-chain polypeptide can be isolated from said supernatant by any of the generally known methods of purifying proteins, more advantageously by anti-human

IgE antibody column chromatography.

The human IgE H-chain polypeptide or a polypeptide equivalent thereto in immunological or biological activities as produced in the present invention is equivalent in immunological or biological activities to the human IgE H-chain polypeptide produced by the conventional method and can be used for the same purpose and in the same manner as the case where the conventional product is used.

Reference Example Isolation of human IgE-encoding mRNA

(1) Cultivation of U-266 cells

Human myeloma cells of the established cell line U-266 [Immunology, 38, 63 (1979)] (2.5×10^5 cells/ml) were cultivated in 500 ml of RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium with 10% fetal calf serum and 0.1 mg/ml each of penicillin and streptomycin (Takeda Chemical Industries) in a roller bottle at 37°C for 3 days.

(2) Preparation of polyadenylic acid-containing RNA

The total RNA extraction from U-266 cells was performed mainly by the method of Glisinet al. [Biochemistry, 13, 2633 (1974)]. Thus, U-266 cells after 3 days of were collected by centrifugation at 2,500 revolutions per minute for 5 minutes using a Sorvall centrifugal rotor GSA, suspended in physiological saline and again centrifuged at 2,500 revolutions per minute for 5 minutes for effecting cell washing. Five to ten volumes of 4% N-laurylsarcosine buffer (Wako Pure Chemical Industries) [2 mg/ml heparin (Wako Pure Chemical Industries), 0.2% diethyl pyrocarbonate (Tokyo Kasei), 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6] was added to the cells, and the cells were mashed 15-20 times using a 30-ml Teflon homogenizer. To the resulting solution was added CsCl to a concentration of 0.5 g/ml, and the solution was layered on 7 ml of 5.7 M CsCl in a centrifugal tube for use in a Spinco SW27 rotor and centrifuged at 26,000 revolutions per minute for 20 hours for RNA sedimentation. The supernatant in the tube was sucked off, the upper part of the tube was cut off so as to leave the lower part thereof

(about 2 cm long), and the RNA sediment was dissolved in 0.4% N-lauroylsarcosine buffer. NaCl was added to the solution to a concentration of 0.2 M, and RNAs were precipitated at -20°C by adding cold ethanol to a final concentration of 70%.

(3) Fractionation by oligo(dT)-cellulose column chromatography

The ethanol-precipitated RNAs were collected by centrifugation on a Spinco SW27.1 rotor at 20,000 revolutions per minute for 20 minutes, and then dissolved in 10 ml of 10 mM Tris·HCl (pH 7.6)-0.5 M NaCl-1 mM EDTA-0.5% SDS buffer. A 10 cc syringe was packed with 4 ml (4 cm high) of oligo(dT)-cellulose dissolved in the same buffer. The above RNA solution was passed through this column and the eluent was again passed through the column to adsorb polyadenylic acid-containing RNAs. The column was washed with the same buffer until the ultraviolet absorption at 260 nm was no more detected, whereby unadsorbed RNAs were washed away. The polyadenylic acid-containing RNAs were then eluted from the column with 10 mM Tris·HCl (pH 7.6)-1 mM EDTA-0.3% SDS buffer (1 ml/fraction) while following the RNAs based on the absorption at 260 nm (O.D.). The RNA fractions were pooled and subjected to ethanol precipitation at -20°C.

(4) Fractionation by sucrose gradient centrifugation.

About 2 mg of the polyadenylic acid-containing RNAs obtained by the above procedure was layered on 10-30% sucrose density gradient solution in 0.05 M NaCl-0.01 M EDTA-0.01 M Tris·HCl (pH 7.6)-0.2% SDS buffer, and centrifuged at 24,000 revolutions per minute and at 20°C for 22 hours using an SW27 rotor. Thereafter, the contents were divided into 40 fractions and, for each fraction, the absorption at 260 nm (O.D.) were measured. The fractions were pooled by fives with an about 18S fraction at the center and subjected to ethanol precipitation. In this manner, the desired mRNA was obtained.

Example 1

(i) Synthesis of single-stranded DNA

A mixture of 5 µg of the mRNA as obtained in the above Reference Example, 100 units of reverse transcriptase (Life Science) and 100 µl of reaction mixture [5 µg of oligo(dT), 1 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 8 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 50 mM Tris·HCl, pH 8.3] was incubated at 42°C for an hour, then deproteinized with phenol, and treated with 0.1 N NaOH at 70°C for 20 minutes for decomposing and removing the RNA.

(ii) Synthesis of double-stranded DNA

The thus-synthesized single-stranded complementary DNA was maintained in 50 µl of a reaction mixture [the same reaction mixture as above except for the absence of the mRNA and oligo(dT)] at 42°C for 2 hours, whereby a double-stranded DNA was synthesized.

(iii) Addition of dC tail

This double-stranded DNA was subjected to the reaction of 60 units of nuclease S1 (Bethesda Research Laboratories) in 50 µl of a reaction mixture (0.1 M sodium acetate, pH 4.5, 0.25 M NaCl, 1.5 mM ZnSO₄) at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was then deproteinized with phenol, and the DNA was precipitated with ethanol. The DNA was subjected to the reaction of 30 units of terminal transferase (Bethesda Research Laboratories) in a reaction mixture [0.14 M potassium cacodylate, 0.3 M Tris (base), pH 7.6, 2 mM dithiothreitol, 1 mM CoCl₂, 0.15 mM dCTP] at 37°C for 3 minutes, whereby about 20 deoxycytidylates were linked to each 3'-end of the double-stranded DNA. The above series of reactions gave about 300 ng of a deoxycytidylate chain-bearing double-stranded DNA.

(iv) Cleavage of Escherichia coli plasmid and addition of dG tail

Separately, 10 µg of Escherichia coli plasmid pBR322 DNA was subjected to the reaction of 20 units of the restriction enzyme PstI in 50 µl of a reaction mixture [50 mM NaCl, 6 mM Tris·HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoethanol, 100 µg/ml bovine serum albumin] at 37°C for 3 hours, whereby the pBR322 DNA was cleaved at the PstI recognition site. After deproteinization with phenol, the cleavage product was further subjected to the reaction

of 30 units of terminal transferase in 50 μ l of a reaction mixture [0.14 M potassium cacodylate, 0.3 M Tris (base), pH 7.6, 2 mM dithiothreitol, 1 mM CoCl_2 , 0.15 mM dGTP] at 37°C for 3 minutes, whereby the above plasmid pBR322 DNA was extended by about 8 deoxyguanylates at each 3'-end.

(v) Annealing of cDNA and Escherichia coli plasmid and transformation of Escherichia coli

The thus-obtained synthetic double-stranded DNA (0.1 μ g) and the above plasmid pBR322 (0.5 μ g) were annealed together by heating in a solution comprising 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, and 1 mM EDTA at 65°C for 2 minutes and then at 45°C for 2 hours, followed by slow cooling. The transformation of Escherichia coli λ 1776 was performed according to the method of Enea et al. [J. Mol. Biol., 96, 495 (1975)].

(vi) Isolation of cDNA-containing plasmid

In this way, 1445 tetracycline -resistant colonies were isolated. The DNA of each of them was fixed on a nitrocellulose filter (vide supra).

Separately, the gene fragment corresponding to the human IgE H-chain polypeptide (vide supra) was labelled with ^{32}P by the nick translation method (vide supra).

The DNA (0.2 μ g) was treated in 25 μ l of a reaction mixture [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoethanol, 10 μCi α - ^{32}P -dATP, 0.4 ng bovine pancreatic DNase I (Werthington)] at room temperature for 2 minutes. Then, 25 units of Escherichia coli DNA polymerase I (Boehringer Mannheim) was added and the reaction was conducted at 15°C for 30 minutes. Purification by extraction with phenol and precipitation with ethanol gave a uniformly ^{32}P -labelled DNA.

With this ^{32}P -DNA as the probe, this was annealed with the DNA fixed on the nitrocellulose filter according to the method of Lawn et al. [Nucleic Acids Res., 9, 6103 (1981)]. As a result of autoradiography, 9 colonies responding to the probe were isolated and named pGET 1 to 9, respectively.

The plasmid DNA was isolated from cells of each of these colonies by the method of Birnboim-Doly [Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)].

Then, the insert was cut out from the plasmid DNA using the restriction enzyme PstI, whereby, among the plasmids separated, pGET2 DNA was found to contain the longest insert. Accordingly, the pGET2 DNA was selected for further use.

The restriction enzyme cleavage map of the cDNA inserted in this plasmid is as shown in Fig. 3. The primary structure (nucleotide sequence) of the cDNA sequence as inserted in the pGET2 plasmid was determined by the dideoxynucleotide synthetic chain termination method and by the method of Maxam-Gilbert. The nucleotide sequence thus determined is as shown in Fig. 4. The polynucleotide of the nucleotide sequence 18-1502 as shown in Fig. 4 corresponds to the polynucleotide as shown in Fig. 1.

The amino acid sequence which this nucleotide sequence codes for, when there is no reading frame shift, is approximately equal to the amino acid sequence of the IgE H-chain polypeptide as reported by Dorrington et al. [Immunological Rev., 41, 3 (1978)]. This confirms that the cDNA inserted in pGET2 codes for the IgE H-chain polypeptide. This cDNA begins with the codon coding for the 63th amino acid in the V region of the IgE H-chain as reported by Dorrington et al. (vide supra), hence wholly codes for the C region. Furthermore, it is believed that it retains the whole structure on the 3'-end side of the mRNA, inclusive of non-coding regions, since the poly(A) structure is present.

Therefore, the C-region polypeptide which carries the antigenicity of human IgE can be produced by adding the translation start codon ATG to the 5'-end of the nucleotide sequence inserted in the above plasmid, without reading frame shift, followed by insertion into another expression plasmid and transformation of Escherichia coli, for instance, therewith.

Example 2

The insert in the plasmid pGET2 as obtained in Example 1 was cut out using the restriction enzyme PstI. This DNA fragment (2 µg) was partially digested from both ends under the reaction of 2 units of nuclease Bal 31 [New England Biolabs; Gray et al., Nucleic Acids Res., 2, 1459 (1975)] in 60 µl of a reaction mixture (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.6 M NaCl, 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) at 30°C for 1 minute.

The DNA was extracted from the reaction mixture with phenol and purified by precipitation with ethanol, and then joined with the adapter 5' CATCGATG^{3'}, which contains the translation start codon and restriction enzyme ClaI-recognition site, using T4 DNA ligase (New England Biolabs).

Separately, the plasmid ptrp771 as an expression plasmid (the vector being pBR322), which contains an Escherichia coli trp promoter portion [promoter- and operator-containing 276 bp DNA fragment; Bennett, G. N. et al., J. Mol. Biol., 121, 113 (1978)], was constructed according to the method disclosed in Japanese Patent Application No. 57-85280/1982.

This expression plasmid ptrp771 was cleaved with the restriction enzyme ClaI. Thereinto, at the cleavage site, inserted was the above-mentioned pGET2 insert DNA-adaptor joining product, which also had been cleaved with ClaI, with the use of T4 DNA ligase (Fig. 5). Using the reaction product, Escherichia coli 294 was transformed according to the method of Cohen et al. (vide supra).

There were obtained a large number of colonies containing plasmids differing in the nuclease Bal 31 digestion region.

Human IgE H-chain polypeptide-producing colonies were selected from among the thus-obtained colonies by the colony immunoassay method [Kemp, D. J. and Cowman, A. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4520 (1981)]. Thus, the colonies grown on a nitrocellulose filter were lysed by contacting with a 0.1 M NaHCO₃-0.1% Triton X100-lysozyme (200 µg/ml) solution and directly transferred onto a cyanogen bromide-activated filter paper (Whatman No. 540) for fixation of the colonies on the filter paper. The filter paper was reacted with goat antihuman IgE antibody (Miles), then washed with a washing solution (50 mM Tris·HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X100, 1% bovine serum albumin), and further reacted with ¹²⁵I-labelled protein A (RCC Amersham, Great Britain). After the reaction, the filter paper was washed well and autoradiographed.

The plasmid contained in the colony that reacted most positively with the anti-human IgE antibody in the above assay was named pGETtrp104. This plasmid was extracted from cells by the method of Birnboim-Doly (vide supra). The nucleotide sequence coding for the human IgE H-chain, which was inserted in ptrp771 and now existing in this pGETtrp104, was determined by the dideoxynucleotide synthetic chain termination method (vide supra). It was revealed that the human IgE H-chain polypeptide-encoding polynucleotide starting with the codon for the 92nd amino acid (according to the report by Dorrington) is located

following the translation start codon without reading frame shift and that the poly(A) structure at the end of the mRNA structure is retained on the 3'-end side (Fig. 4). Escherichia coli 294/pGETtrp104 has been deposited with the Institute for Fermentation, Osaka under deposit No. IFO 14284.

Example 3

- (i) From the plasmid PGET2 as obtained in Example 1, the insert was cut out with the restriction enzyme PstI. This DNA fragment was further cleaved with the restriction enzyme SalI. There was thus obtained an about 1,150 bp DNA fragment having the SalI site at one end and the PstI site at the other. The single-stranded cohesive DNA terminus at the SalI site of this DNA fragment was filled in with Escherichia coli DNA polymerase I large fragment and the DNA fragment was joined with the adapter 5'GCATCGATGC^{3'} containing the translation start codon and restriction enzyme ClaI recognition site with the use of T4 DNA ligase (New England Biolabs). The joining product was cleaved with the restriction enzyme ClaI and then joined with the expression plasmid ptrp771 cleaved in advance with the restriction enzymes ClaI and PstI, with the use of T4 DNA ligase (Fig. 6). The above series of reactions resulted in construction of a human IgE H-chain polypeptide expression plasmid, pGETtrp302, containing the translation start codon and the Leu-encoding codon CTC newly introduced without reading frame shift at a site downstream from the trp promoter, and coding for the human IgE H-chain polypeptide starting from the codon for the 218th amino acid according to the report of Dorrington. Escherichia coli 294 was transformed with this expression plasmid according to the method of Cohen et al. to give a desired strain carrying the plasmid pGETtrp302.
- (ii) From the plasmid pGET2 as obtained in Example 1, the insert was cut out with the restriction enzyme PstI. This DNA fragment was further cleaved with the restriction

enzyme HinfI. There was thus obtained an about 810 bp DNA fragment with the HinfI site at one end and the PstI site at the other.

The single-stranded cohesive DNA terminus at the HinfI site of this DNA fragment was filled in with Escherichia coli DNA polymerase I large fragment (Bethesda Research Laboratories) so as to render the end blunt, and then the DNA fragment was joined with the same adapter as used in Example 3-(i), i.e. 5'GCATCGATGC^{3'}, with the use of T4 DNA ligase.

The joining product was cleaved with the restriction enzyme ClaI and joined with the expression plasmid ptrp771 cleaved in advance with the restriction enzymes ClaI and PstI, with the use of T4 DNA ligase (Fig. 6). The above series of reactions resulted in construction of a human IgE H-chain polypeptide expression plasmid, pGETtrp410, containing the translation start codon and the codon CAT for His at a site downstream from the trp promoter, and coding for the human IgE H-chain polypeptide starting with the codon for the 331st amino acid according to Dorrington without reading frame shift. Escherichia coli 294 was transformed with this plasmid according to the method of Cohen et al. to give a desired strain carrying the plasmid pGETtrp410.

Example 4

The IgE H-chain expression plasmid-carrying strains as obtained in Examples 2 and 3 were cultivated in 20 ml of M9 medium containing 1% glucose and 0.4% Casamino acids at 37°C for 4 hours. Then, indolyl acrylic acid was added to a concentration of 30 µg/ml, and the cultivation was continued at 37°C for 3 hours. Cells were harvested, washed with saline, and lysed by suspending in 0.5 ml lysing solution (10 mM Tris·HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA,

0.2 M NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.02% Triton X100, 0.1 mg/ml lysozyme) and allowing the suspension to stand at 0°C for 45 minutes and then at 37°C for 2 minutes. The lysate was further subjected to slight (30-second) ultrasonic treatment for breaking celluler DNAs which were dissolved. The lysate was then centrifuged at 4°C at 15,000 rpm (Sorvall SS34 rotor) for 30 minutes. The thus-obtained supernatant was assayed for IgE activity by the RIST method (vide supra) using an IgE assay kit (IgE Test-Shionogi; Shionogi).

The results are shown in Table 2. The strain carrying pGETtrp302 produced the human IgE H-chain polypeptide at the highest rate (480 ng/ml extract).

Table 2

Transformant	IgE H-chain production (ng/ml extract)
<u>E. coli</u> 294 (ptrp771)	0
<u>E. coli</u> 294 (pGETtrp104)	84
<u>E. coli</u> 294 (pGETtrp302)	480
<u>E. coli</u> 294 (pGETtrp410)	48

Example 5

Anti-human IgE monoclonal antibody was bound to a water-insoluble carrier Affigel 10 (Bio-Rad) by the method described in Reference Example 2 of Japanese Patent Application No. 19,324/1981.

5 ml of the extract from pGETtrp302-carrying cells as obtained in Example 4 was treated on a 1-ml column of the anti-human IgE monoclonal antibody-Affigel 10. The column was washed with 50 ml of PBS (20 mM phosphate buffer, pH 6.8, 0.15 M NaCl) containing 20% dextrose, and the human IgE H-chain adsorbed on the column was eluted from the column with 5 ml of 0.2 M acetic acid-0.15 M NaCl solution. The eluate was immediately neutralized, and dialyzed against 1 liter of PBS at 5°C for 24 hours. This procedure gave the human IgE H-chain polypeptide in a purity of not lower than 80% at a recovery rate of about 50%.

4. Brief Description of the Drawings

Fig. 1 illustrates the nucleotide sequence coding for the human IgE H-chain polypeptide, Fig. 2 illustrates the amino acid sequence corresponding to the nucleotide sequence shown in Fig. 1, Fig. 3 shows the restriction enzyme map for the cDNA in pGET2 as obtained in Example 1, and Fig. 4 illustrates the primary structure (nucleotide sequence) of said cDNA. Fig. 5 shows the construction scheme in Example 2, and Fig. 6 shows the construction scheme in Example 3. The portion indicated by //// represents the human IgE H chain-encoding fragment.

Agent, Registered Patent

Attorney: Sakuji Amai

Figure 1

	10	20	30	40	50	
	*	*	*	*	*	
AGATTT	CAGGG	CAGGG	TACCAT	GACCA	GAGAC	CGTCCTTCAGTACAGC
TCTAAAG	TCCCG	TCCCAG	TGGTACT	GGTCTCT	GCGCAG	GAAAGTCATGTCG
						50
	*	*	*	*	*	
CTACAT	GGACCT	GAGAAG	TCTGAG	ATCTG	ACGACT	CGGCCGTGTTTTACT
GATGTAC	CTGGACT	CTTCAG	ACTCTAG	ACTGCT	GAGCCG	GCACAAAATGA
						100
	*	*	*	*	*	
GTGCGAA	AAGTG	ACCC	TTTTT	GGAGT	GATTAT	TATAACTTTGACTACTCG
CACGCTT	TTCACT	GGGAAA	ACCTCA	CTAATA	TATTGA	AACTGATGAGC
						150
	*	*	*	*	*	
TACACTT	TGGACG	TCTGGG	GCCAAG	GGGACC	ACGGTCA	CCGTCTCCTCAGC
ATGTGAA	ACCTGC	AGACCC	CGGTTCC	CTGGTGC	CAGTGGC	AGAGGAGTCG
						200
	*	*	*	*	*	
CTCCAC	ACAGAG	CCCATC	CGTCTT	CCCTTG	ACCCGCT	GCTGCAAAAACA
GAGGTGT	GTCTCG	GGTAGG	CAGAAG	GGGAACT	GGGCGAC	GACGTTTTTGT
						250
	*	*	*	*	*	
TTCCCT	TCCAAT	GCCAC	CTCCGT	GACTCT	GGGCTGC	CTGGCCACGGGCTAC
AAGGGAG	GTTAC	GGTGG	AGGCACT	GAGACCC	GACGGAC	CGGTGCCCGATG
						300
	*	*	*	*	*	
TTCCCG	GAGCCG	TGATGG	TGACCT	GGGAC	ACAGGCT	CCCTCAACGGGAC
AAGGGCT	CGGCCA	CTACCA	CTGGAC	CCCTGT	GTCCGAG	GGGAGTTGCCCTG
						350
	*	*	*	*	*	
AACTAT	GACCTT	ACCAGC	CACCAC	CCCTCA	CGCTCT	CTGGTCACTATGCCA
TGATACT	GGAATG	GTGCG	TGGTGG	GAGTGC	GAGAGAC	CAGTGATACGGT
						400
	*	*	*	*	*	
CCATCAG	CTTGCT	GAUCGT	CTCGGG	TGCGTG	GGGCAAG	CAGATGTTACCC
GGTAGTC	GAACG	ACTGGC	AGAGCC	ACGCAC	CCCGGTT	CGTCTACAAGTGG
						450
	*	*	*	*	*	
TGCCGT	GTGGC	ACACACT	CCATCG	TCCAC	AGACTGG	GTCGACAAACAAAC
ACGGCAC	ACCGT	GTGTG	AGGTAG	CAGGTG	CTGACCC	AGCTGTTGTTTTG
						500

..continued

Figure 1

10	20	30	40	50	
* * * * *					
CTTCAGCGTCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCCACCGTGAAGATCTTAC					550
GAAGTCGCAGACGAGGTCCCTGAAGTGGGGCGGGTGGCACTTCTAGAATG					
* * * * *					
AGTCGTCTCGGACGGCGGGCGGGCACTTCCCCCGACCATCCAGCTCCTG					600
TCAGCAGGACGCTGCCGCCGCCGTGAAGGGGGCTGGTAGGTCGAGGAC					
* * * * *					
TGCCTCGTCTCTGGGTACACCCAGGGACTATCAACATCACCTGGCTGGA					650
ACGGAGCAGAGACCCATGTGGGTCCCTGATAGTTGTAGTGGACCGACCT					
* * * * *					
GGACGGGCAGGTCATGGACGTGGACTTGTCCACCGCCTCTACCACGCAGG					700
CCTGCCCGTCCAGTACCTGCACCTGAACAGGTGGCGGAGATGGTGCGTCC					
* * * * *					
AGGGTGAGCTGGCCTCCACACAAAGCGAGCTCACCCCTCAGCCAGAAGCAC					750
TCCCACTCGACCGGAGGTGTGTTTCGCTCGAGTGGGAGTCGGTCTTCGTG					
* * * * *					
TGGCTGTCAGACCGCACCTACACCTGCCAGGTACCTATCAAGGTCACAC					800
ACCGACAGTCTGGCGTGGATGTGGACGGTCCAGTGGATAGTTCCAGTGTG					
* * * * *					
CTTTGAGGACAGCACCAAGAAGTGTGCAGATTCCAACCCGAGAGGGGTGA					850
GAAACTCCTGTCTGTGGTTCTTCACACGTCTAAGGTTGGGCTCTCCCCACT					
* * * * *					
GCGCCTACCTAAGCCGGGCCAGCCCGTTCCACCTGTTTCATCCGCAAGTCG					900
CGCGGATGGATTCCGGCCGGGTCCGGCAAGCTGGACAAGTAGGCGTTCCAGC					
* * * * *					
CCCACGATCACCTGTCTGGTGGTGGACCTGGCACCCAGCAAGGGGACCGT					950
GGGTGCTAGTGGACAGACCACCACTGGACCGTGGGTGCTTCCCCTGGCA					
* * * * *					
GAACCTGACCTGGTCCCGGGCCAGTGGGAAGCCTGTGAACCACTCCACCA					1000
CTTGGACTGGACAGGGGCCCGGTACCCCTTCGGACACTTGGTGAAGTGGT					

.. coninued

Figure 1

10	20	30	40	50	
* * * *					
GAAAGGAGGAGAAGCAGCGCAATGGCAGTTAACCGTCACGTCCACCCTG					1050
CTTTCCTCCTCTTCGTGCGGTTACCGTGCAATTGGCAGTGCAGGTGGGAC					
* * * *					
CCGGTGGGCACCCGAGACTGGATCGAGGGGGAGACCTACCAGTGCAGGGT					1100
GGCCACCCGTGGGCTCTGACCTAGCTCCCCCTCTGGATGGTACAGTCCCA					
* * * *					
GACCCACCCCACTGCCAGGGCCCTCATGCGGTCCACGACCAAGACCA					1150
CTGGGTGGGGTGGACGGGTCCCGGGAGTACGCCAGGTGCTGGTTCTGGT					
* * * *					
GCGGCCCGCGTGCTGCCCGGAAGTCTATGCGTTTGCGACGCCGGAGTGG					1200
CGCCGGGGCGCAGCAGGGGGCCTTCAGATACGCAACGCTGCGGCCCTCACC					
* * * *					
CCGGGGAGCCGGGACAAGCGCACCCCTCGCCTGCCTGATCCAGAACTTCAT					1250
GGCCCCCTCGGCCCTGTTGCGGTGGGAGCGGACGGACTAGGTCTTGAAGTA					
* * * *					
GCCTGAGGACATCTCGGTGCAGTGGCTGCACAACGAGGTGCAGCTCCCGG					1300
CGGACTCCTGTAGAGCCACGTACCGACGTGTTGCTCCACGTCCAGGGCC					
* * * *					
ACGCCCCGGCACAGCAGCAGCGAGCCCCGCAAGACCAAGGGCTCCGGCTTC					1350
TGCGGGCCGTGTGCTGCTGCGTCGGGGCGTTCTGGTTCCCGAGGCCGAAG					
* * * *					
TTCGTCTTCAGCCGCCTGGAGGTGACCAGGGCCGAATGGGAGCAGAAAGA					1400
AAGCAGAAGTCGGCGGACCTCCACTGGTCCCGGCTTACCCTCGTCTTTCT					
* * * *					
TGAGTTCATCTGCCGTGCAGTCCATGAGGCAGCGAGCCCCTCACAGACCG					1450
ACTCAAGTAGACGGCACGTACGGTACTCCGTGCTCGGGGAGTGTCTGGC					
* * * *					
TCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGGTAAATGA					
AGGTCCCTCGCCACAGACATTTAGGGCCATTTACT					

Agent, Registered Patent
Attorney: Sakuji Amai

Figure 2

ARG PHE GLN GLY ARG VAL THR MET THR ARG ASP ALA SER PHE SER
THR ALA TYR MET ASP LEU ARG SER LEU ARG SER ASP ASP SER ALA
VAL PHE TYR CYS ALA LYS SER ASP PRO PHE TRP SER ASP TYR TYR
ASN PHE ASP TYR SER TYR THR LEU ASP VAL TRP GLY GLN GLY THR
THR VAL THR VAL SER SER ALA SER THR GLN SER PRO SER VAL PHE
PRO LEU THR ARG CYS CYS LYS ASN ILE PRO SER ASN ALA THR SER
VAL THR LEU GLY CYS LEU ALA THR GLY TYR PHE PRO GLU PRO VAL
MET VAL THR TRP ASP THR GLY SER LEU ASN GLY THR THR MET THR
LEU PRO ALA THR THR LEU THR LEU SER GLY HIS TYR ALA THR ILE
SER LEU LEU THR VAL SER GLY ALA TRP ALA LYS GLN MET PHE THR
CYS ARG VAL ALA HIS THR PRO SER SER THR ASP TRP VAL ASP ASN
LYS THR PHE SER VAL CYS SER ARG ASP PHE THR PRO PRO THR VAL
LYS ILE LEU GLN SER SER CYS ASP GLY GLY GLY HIS PHE PRO PRO
THR ILE GLN LEU LEU CYS LEU VAL SER GLY TYR THR PRO GLY THR
ILE ASN ILE THR TRP LEU GLU ASP GLY GLN VAL MET ASP VAL ASP
LEU SER THR ALA SER THR THR GLN GLU GLY GLU LEU ALA SER THR
GLN SER GLU LEU THR LEU SER GLN LYS HIS TRP LEU SER ASP ARG
THR TYR THR CYS GLN VAL THR TYR GLN GLY HIS THR PHE GLU ASP
SER THR LYS LYS CYS ALA ASP SER ASN PRO ARG GLY VAL SER ALA
TYR LEU SER ARG PRO SER PRO PHE ASP LEU PHE ILE ARG LYS SER
PRO THR ILE THR CYS LEU VAL VAL ASP LEU ALA PRO SER LYS GLY

..continued

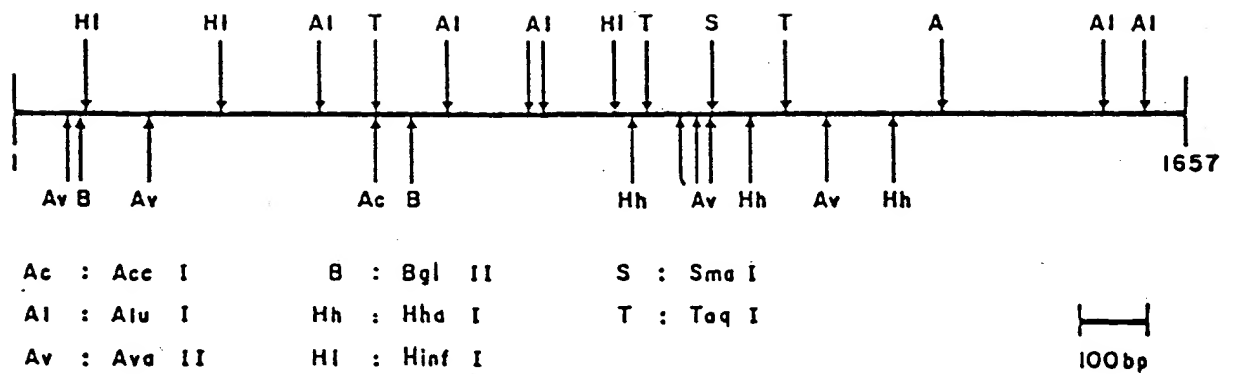
Figure 2

THR VAL ASN LEU THR TRP SER ARG ALA SER GLY LYS PRO VAL ASN
HIS SER THR ARG LYS GLU GLU LYS GLN ARG ASN GLY THR LEU THR
VAL THR SER THR LEU PRO VAL GLY THR ARG ASP TRP ILE GLU GLY
GLU THR TYR GLN CYS ARG VAL THR HIS PRO HIS LEU PRO ARG ALA
LEU MET ARG SER THR THR LYS THR SER GLY PRO ARG ALA ALA PRO
GLU VAL TYR ALA PHE ALA THR PRO GLU TRP PRO GLY SER ARG ASP
LYS ARG THR LEU ALA CYS LEU ILE GLN ASN PHE MET PRO GLU ASP
ILE SER VAL GLN TRP LEU HIS ASN GLU VAL GLN LEU PRO ASP ALA
ARG HIS SER THR THR GLN PRO ARG LYS THR LYS GLY SER GLY PHE
PHE VAL PHE SER ARG LEU GLU VAL THR ARG ALA GLU TRP GLU GLN
LYS ASP GLU PHE ILE CYS ARG ALA VAL HIS GLU ALA ALA SER PRO
SER GLN THR VAL GLN ARG ALA VAL SER VAL ASN PRO GLY LYS --

Agent, Registered Patent

Attorney: Sakuji Amai

Figure 3



Agent, Registered Patent
Attorney: Sakuji Amai

Figure 4

10	20	30	40	50	
* * * *					
GGGGGGGGGGGGGGGGGAGATTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGAGAC					50
CCCCCCCCCCCCCGCTCTAAAGTCCCGTCCCAGTGGTACTGGTCTCTG					
* * * *					
GCGTCCTTCAGTACAGCCTACATGGACCTGAGAAGTCTGAGATCTGACGA					100
CGCAGGAAGTCATGTCCGATGTACCTGGACTCTTCAGACTCTAGACTGCT					
* * * *					
CTCGGCCGTGTTTTACTGTGCGAAAAGTGACCCTTTTTGGAGTGATTATT					150
GAGCCGGCACAAAATGACACGCTTTTCACTGGGAAAAACCTCACTAATAA					
* * * *					
ATAACTTTGACTACTCGTACACTTTGGACGTCTGGGGCCAAAGGGACCCAG					200
TATTGAAACTGATGAGCATGTGAAACCTGCAGACCCCGGTTCCCTGGTG					
* * * *					
GTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACACAGAGCCCATCCGTCTTCCCCTTGAC					250
CAGTGGCAGAGGAGTCCGAGGTGTGTCTCGGGTAGGCAGAGGGGGAAGTG					
* * * *					
CCGCTGCTGCAAAAACATTCCCTCCAATGCCACCTCCGTGACTCTGGGCT					300
GGCGACGACGTTTTTGTAGGGAGGTTACGGTGGAGGCACTGAGACCCGA					
* * * *					
GCCTGGCCACGGGCTACTTCCCAGGAGCCGGTGATGGTGACCTGGGACACA					350
CGGACCGGTGCCCGATGAAGGGCCTCGGCCACTACCACTGGACCCCTGTGT					
* * * *					
GGCTCCCTCAACGGGACAACATGACCTTACCAGCCACCACCCCTCACGCT					400
CCGAGGGAGTTGCCCTGTTGATACTGGAATGGTCGGTGGTGGGAGTGGGA					
* * * *					
CTCTGGTCACTATGCCACCATCAGCTTGCTGACCGTCTCGGGTGGCTGGG					450
GAGACCAGTGATACGGTGGTAGTCGAACGACTGGCAGAGCCCACGCACCC					
* * * *					
CCAAGCAGATGTTACCTGCCGTGTGGCACACACTCCATCGTCCACAGAC					500
GGTTGCTCTACAAGTGGACGGCACACCSTGTGTGAGGTAGCAGGTGTCTG					

...continued

Figure 4

	10	20	30	40	50	
	*	*	*	*	*	
TGGGTCGACAACAAACCTTCAGCGTCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCC						550
ACCCAGCTGTTGTTTTGGAAGTCGCAGACGAGGTCCCTGAAGTGGGGCGG						
	*	*	*	*	*	
CACCGTGAAGATCTTACAGTCGTCTCGACGGCGGGCGGGCACTTCCCCC						600
GTGGCACTTCTAGAATGTCAGCAGGACGCTGCCGCCGCCCGTGAAGGGGG						
	*	*	*	*	*	
CGACCATCCAGCTCCTGTGCCTCGTCTCTGGGTACACCCCAGGGACTATC						650
GCTGGTAGGTGAGGACACGGAGCAGAGACCCATGTGGGGTCCCTGATAG						
	*	*	*	*	*	
AACATCACCTGGCTGGAGGACGGGCAGGTCATGGACGTGGACTTGTCCAC						700
TTGTAGTGGACCGACCTCCTGCCCGTCCAGTACCTGCACCTGAACAGGTG						
	*	*	*	*	*	
CGCCTCTACCACGCAGGAGGGTGAGCTGGCCTCCACACAAAGCGAGCTCA						750
GCGGAGATGGTGCGTCTCCCACTCGACCGGAGGTGTGTTTCGCTCGAGT						
	*	*	*	*	*	
CCCTCAGCCAGAAGCACTGGCTGTCAGACCGCACCTACACCTGCCAGGTC						800
GGGAGTCGGTCTTCGTGACCGACAGTCTGGCGTGGATGTGGACGGTCCAG						
	*	*	*	*	*	
ACCTATCAAGGTCACACCTTTGAGGACAGCACCAAGAAGTGTGCAGATTC						850
TGGATAGTTCCAGTGTGGAAACTCCTGTCTGTTCTTCACACGTCTAAG						
	*	*	*	*	*	
CAACCCGAGAGGGGTGAGCGCCTACCTAAGCCGCCAGCCCGTTCCGACC						900
GTTGGGCTCTCCCCACTCGCGGATGGATTCCGGCCGGGTCCGGCAAGCTGG						
	*	*	*	*	*	
TGTTTCATCCGCAAGTCGCCACGATCACCTGTCTGGTGGTGGACCTGGCA						950
ACAAGTAGGCGTTCAGCGGGTGCTAGTGGACAGACCACCACTGGACCGT						
	*	*	*	*	*	
CCCAGCAAGGGGACCGTGAACCTGACCTGGTCCCGGGCCAGTGGGAAGCC						1000
GGGTGCTTCCCTGGCACTTGGACTGGACCAAGGGCCCGGTACCCCTTCGG						

..continued

Figure 4

10	20	30	40	50	
* * * *					
TGTGAACCACTCCACCAGAAAGGAGGAGAAGCAGCGCAATGGCAGCTTAA					1050
ACACTTGGTGAGGTGGTCTTTCTCTCTTCGTCCGCTTACCGTGCAATT					
* * * *					
CCGTACAGTCCACCCTGCCGGTGGGCACCCGAGACTGGATCGAGGGGGAG					1100
GGCAGTGCAGGTGGGACGGCCACCCGTGGGCTCTGACCTAGCTCCCCCTC					
* * * *					
ACCTACCAGTGCAGGGTGACCCACCCCCACCTGCCCAGGGCCCTCATGCG					1150
TGGATGGTCACGTCCCACTGGGTGGGGGTGGACGGGTCCCGGGAGTACGC					
* * * *					
GTCCACGACCAAGACCAGCGGCCCGCGTGCTGCCCGGAAGTCTATGCGT					1200
CAGGTGCTGGTTCTGGTCGCCGGGGCGCACGACGGGGCCTTCAGATACGCA					
* * * *					
TTGCGACGCCGGAGTGGCCGGGGAGCCGGGACAAGCGCACCCCTCGCCTGC					1250
AACGCTGCGGCCCTCACCGGCCCTCGGCCCTGTTCCGCTGGGAGCGGACG					
* * * *					
CTGATCCAGAACTTCATGCCTGAGGACATCTCGGTGCAGTGGCTGCACAA					1300
GACTAGGTCTTGAAGTACGGACTCCTGTAGAGCCACGTACCCGACGTGTT					
* * * *					
CGAGGTGCAGCTCCCGGACGCCCGGCACAGCAGCAGCCCGCAAGA					1350
GCTCCACGTGCAGGGCCCTGCGGGCCGTGTCTGTCTGCGTGGGGCCGTCT					
* * * *					
CCAAGGGCTCCGGCTTCTTCGTCTTCAGCCGCCCTGGAGGTGACCAGGGCC					1400
GGTTCCCGAGGCCGAAGAAGCAGAAGTCGGCGGACCTCCACTGGTCCCGG					
* * * *					
GAATGGGAGCAGAAAGATGAGTTCATCTGCCGTGCAGTCCATGAGGCAGC					1450
CTTACCCTCGTCTTTCTACTCAAGTAGACGGCACGTCAAGTACTCCGTCG					
* * * *					
GAGCCCCCTCACAGACCGTCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGGTAAAT					1500
CTCGGGGAGTGTCTGGCAGGTGCTCGCCACAGACATTTAGGGCCATTTA					

..continued

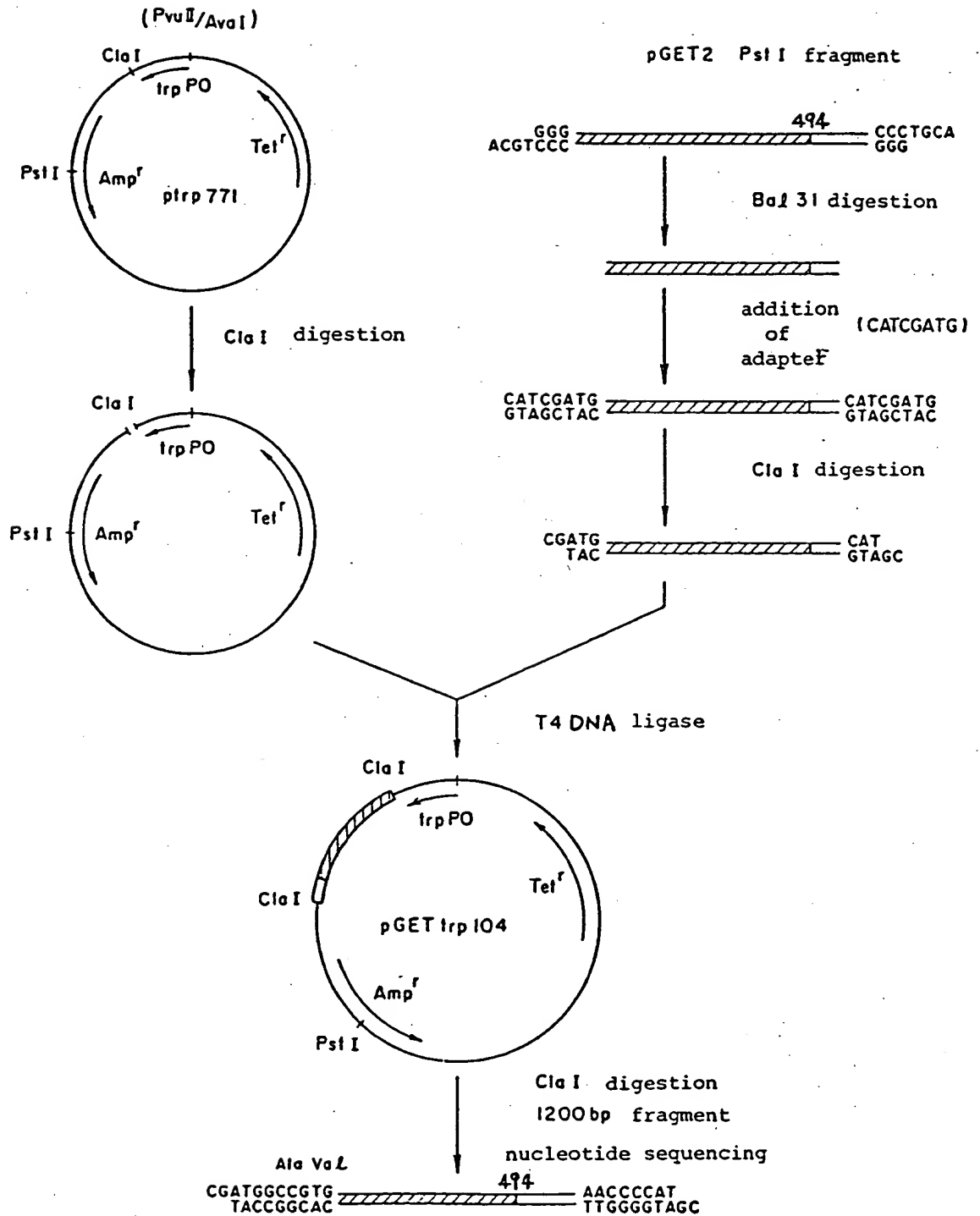
Figure 4

10	20	30	40	50	
	*	*	*	*	*
GACGTA	CTGCCT	CCCTCC	CTCCAG	GGGCTC	CCATCC
AGCTGT	GTCAGTG				
CTGCAT	GAGGAC	GGGAGG	GGGAGG	GTCCCG	AGGTAG
GTGAC	ACGTCAC				
					1550
	*	*	*	*	*
GGGAGG	ACTGGC	CAGACCT	TCTGTCC	ACTGTT	GCAATG
ACCCCA	GGGAAG				
CCCTCCT	GACCGG	TCTGGA	AGACAG	GTGACA	ACGTTA
CTGGGG	TCCTTCG				
					1600
	*	*	*	*	*
TACCCCA	AATAAA	CTGTGC	CTGCTC	AGAAAA	AAAAAAAA
ACCCCCC					
ATGGGGG	TTATTT	GACACG	GACGAG	TCTTTT	TTTTTTTT
TTTTTT	TTTTTT	TTTTTT	TTTTTT	TTTTTT	TTTTTT
					1650
	*	*	*	*	*
CCCCCCC					
GGGGGGG					

TOTAL NUMBER OF NUCLEOTIDE PAIRS = 1657

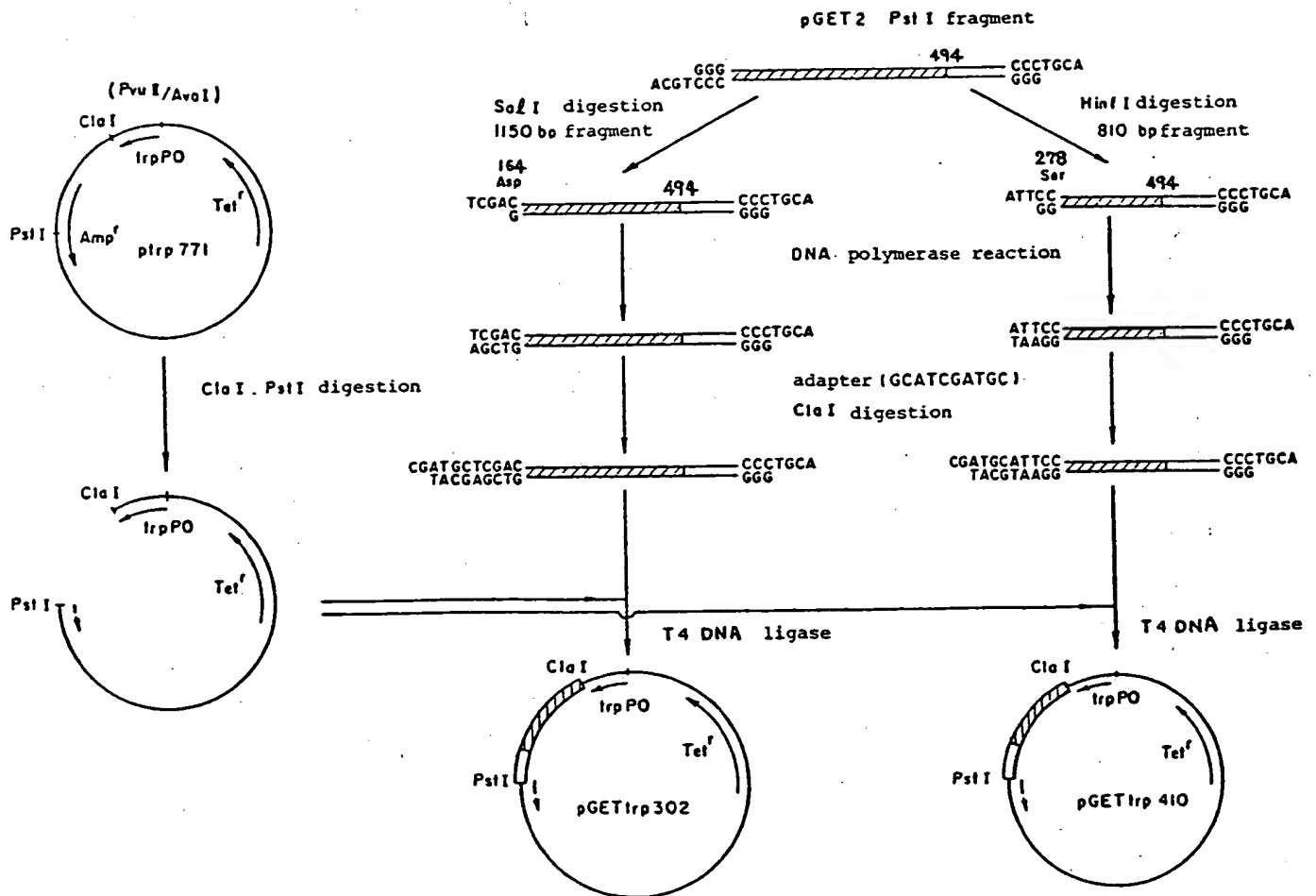
Agent, Registered Patent
Attorney: Sakuji Amai

Figure 5



Agent, Registered Patent
Attorney: Sakuji Amai

Figure 6



Agent, Registered Patent
Attorney: Sakuji Amai

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.